

Aus der Klinik für Neurologie  
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Richard Dodel  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Messung der murinen anti-humanen Antikörperreaktion  
sowie Beurteilung der allgemeinen Aktivität und Kognition  
von gesunden adulten Mäusen nach Behandlung mit  
intravenösen Immunglobulinen

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Isabelle Fülber aus Hamburg  
Marburg 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
26.04.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr.R. Dodel

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Schnare

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

---

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung.....	VII
Abstract.....	IX
Abkürzungsverzeichnis .....	XI
I    Einleitung .....	1
1.1    Immunologischer Hintergrund .....	1
1.1.1    Molekularstruktur der Immunglobuline.....	1
1.1.2    Das IgG <sub>1</sub> -Molekül.....	3
1.2    IVIg.....	5
1.2.1    Wirkmechanismus von IVIg .....	5
1.2.2    Nebenwirkungen der Immunglobulintherapie .....	8
1.3    Anti-humane und Anti-murine Antikörperreaktionen.....	9
1.3.1    HAMA-Reaktion.....	9
1.3.2    MAHA-Reaktion.....	10
1.4    Unterschiede im Immunsystem zwischen Mensch und Maus .....	11
1.5    Fragestellung .....	13
II    Material und Methoden.....	16
2.1    Technische Installationen.....	16
2.2    Versuchstiere und Tierhaltung .....	17
2.2.1    Die C57/B6J-Maus.....	17
2.2.2    Behandlung .....	19
2.3    Verhaltensversuche.....	21
2.3.1    Das Openfield.....	21
2.3.1.1    Versuchsapparatur.....	22

2.3.1.2	Versuchsdurchführung .....	25
2.3.1.3	Datenanalyse .....	26
2.3.2	Y-Maze .....	26
2.3.2.1	Versuchsapparatur des Y-Maze .....	26
2.3.2.2	Versuchsdurchführung .....	27
2.3.2.3	Datenanalyse .....	28
2.4	Probengewinnung .....	28
2.4.1	Narkose .....	28
2.4.2	Organentnahme und Probengenerierung .....	29
2.5	ELISA zur Bestimmung der MAHA-Antwort .....	30
2.5.1	Enzyme linked immunosorbent assay .....	30
2.5.2	ELISA des Serum .....	33
2.5.3	ELISA des Gehirn .....	34
2.6	Statistische Verfahren .....	36
2.7	Verwendete Materialien.....	38
2.7.1	Chemikalien und Kits .....	38
2.7.2	Lösungen und Puffer .....	39
2.7.3	Medikamente und Arzneimittel.....	40
2.7.4	Antikörper .....	41
2.8	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	41
III	Ergebnisse .....	45
3.1	Auswertung der Verhaltensversuche.....	45
3.1.1	Einfluss von IVIG auf Lokomotion und Exploration im Openfieldversuch .....	45
3.1.2	Einfluss von IVIG auf Alternation und räumliches Gedächtnis im Y- Mazeversuch.....	51
3.2	Auswertung von Körper- und Milzgewicht .....	56
3.3	Auswertung der MAHA-Antwort .....	58

3.3.1	MAHA-Antwort im Serum.....	59
3.3.2	MAHA-Antwort im Gehirn .....	60
IV	Diskussion.....	62
4.1	Ziel der Studie .....	62
4.2	Ausgangslage/ Studienlage.....	63
4.3	Einfluss der IVIG-Therapie auf das Verhalten von .....	66
	C57/B6J-Mäusen .....	66
4.3.1	Einfluss der IVIG-Therapie auf das Explorationsverhalten im Openfield.....	66
4.3.2	Einfluss der IVI-Therapie auf komplexere Verhaltensweisen und das Gedächtnis im Y-Maze .....	67
4.3.3.	Zusammenfassende Ergebnisdiskussion der Verhaltensversuche	68
4.3.4	Diskussion der Verhaltensmethoden .....	69
4.3.5	Diskussion bezüglich der Versuchstiere .....	71
4.4.	Körper- und Milzgewicht.....	72
4.5	MAHA-Antwort nach rezidivierenden IVIG-Injektionen über elf Wochen Versuchsdauer.....	73
4.5.1	MAHA-Antwort im Serum.....	73
4.5.2	MAHA-Antwort im Gehirn .....	75
4.5.3	Zusammenfassende Ergebnisdiskussion der murinen Immunreaktion nach IVIG-Therapie .....	76
4.5.4	Diskussion der immunologischen Techniken.....	77
4.6	Weiterführende Studien.....	78
4.7	Ausblick.....	79
	Literaturverzeichnis .....	80
	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	89
	Danksagung .....	90
	Ehrenwörtliche Erklärung .....	91

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Durchschnittlicher Anteil der IgG-Subklassen in humanem Serum in Prozent.....	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines IgG-Moleküls und seiner antigenbindenden Regionen .....	4
Abbildung 3: Behandlungsablauf der C57/B6J-Mäuse .....	20
Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der Verhaltensversuche und der Probengewinnung. ....	20
Abbildung 5: Versuchsaapparatur des Openfields zur Messung der lokomotorischen Aktivität.....	24
Abbildung 6: Versuchsregionen des Openfield .....	25
Abbildung 7: Versuchsaapparatur des Y-Maze .....	27
Abbildung 8: Prinzip des Sandwich-ELISA mit kurzer Erläuterung der einzelnen Schritte .....	32
Abbildung 9: Schematische Darstellung der methodischen Arbeitsschritte des ELISA im zeitlichen Ablauf. ....	35
Abbildung 10: Explorationsverhalten weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse, beurteilt anhand der zurückgelegten Wegstrecke im Openfieldversuch über eine Versuchsdauer von 20 Minuten.....	47
Abbildung 11: Explorationsverhalten weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse, beurteilt anhand der zurückgelegten Wegstrecke im Openfieldversuch über eine Versuchsdauer von 20 Minuten.....	48
Abbildung 12: Explorationsverhalten weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse beurteilt anhand des absoluten Aufrichteverhaltens im Openfieldversuch über eine Versuchsdauer von 20 Minuten.....	49
Abbildung 13: Explorationsverhalten weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse beurteilt anhand des Aufrichteverhaltens im Zentrum im Openfieldversuch über eine Versuchsdauer von 20 Minuten.....	50
Abbildung 14: Arbeitsgedächtnis weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse im Y-Mazeversuch anhand der Alternation über eine Versuchsdauer von 10 Minuten. ....	52

Abbildung 15: Arbeitsgedächtnis weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse im Y-Mazeversuch anhand der absoluten Anzahl der Eintritte in die Arme der Y-Mazeversuchsapparatur über eine Versuchsdauer von 10 Minuten.....	53
Abbildung 16: Arbeitsgedächtnis weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse im Y-Mazeversuch anhand der zurückgelegten Wegstrecke über eine Versuchsdauer von 10 Minuten.....	54
Abbildung 17: Arbeitsgedächtnis weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse im Y-Mazeversuch anhand der Zeit, die in den Armen der Y-Mazeapparatur verbracht wurde prozentual zur Versuchsdauer von 10 Minuten. ....	55
Abbildung 18: Verlauf des Körpergewichts von weiblichen adulten C57/B6J-Mäusen unter IVIG-Behandlung über eine Beobachtungsdauer von elf Wochen. ....	57
Abbildung 19: Verlauf des Milzgewichtes von weiblichen adulten C57/B6J-Mäusen unter IVIG-Behandlung über eine Beobachtungsdauer von elf Wochen. ....	58
Abbildung 20: MAHA-Konzentration im Serum von weiblichen adulten C57/B6J-Mäusen unter IVIG-Behandlung über eine Beobachtungsdauer von elf Wochen. ....	60



## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Immunregulatorische Effekte von Immunglobulinpräparaten .....	6
Tabelle 2: Vergleich der Immunglobulinklassen verschiedener Spezies .....	13
Tabelle 3: Chemikalien und Kits .....	38
Tabelle 4: Lösungen und Puffer .....	39
Tabelle 5: Medikamente und Arzneimittel .....	40
Tabelle 6: Antikörper .....	41
Tabelle 7: Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	41
Tabelle 8: MAHA-Reaktion im Gehirn weiblicher Wildtyp C57/B6J-Mäuse nach wöchentlicher Injektion von 400µg IVIG i.p.. .....	61

## Zusammenfassung

---

Präparate aus intravenösen Immunglobulinen (IVIG) sind Blutprodukte, welche bereits in der klinischen Therapie verschiedener entzündlicher, Autoimmun- oder Immundefizienzerkrankungen sowie insbesondere im Bereich der Therapieforschung von neurodegenerativen Erkrankungen wie unter anderem der Alzheimer Demenz (AD) eingesetzt werden.

Der molekulare Wirkmechanismus von IVIG ist noch nicht endgültig geklärt. Hierfür fehlen unter anderem noch präklinische Einschätzungen der therapeutischen Effizienz von IVIG in Tiermodellen, welche wertvolle Informationen für den Wirkmechanismus *in vivo* liefern können. Um Erkenntnisse über die Wirk- und Funktionsweise von IVIG *in vivo* zu erhalten, ist es essentiell, die murine Reaktion auf humane Antikörper (murine anti-humane Antikörperreaktion, MAHA-Reaktion) im Tiermodell zu erfassen, bevor man immunmodulatorische Therapieversuche starten und folgend auf die therapeutische Effizienz *in vivo* rückschließen kann.

Basierend auf der Kenntnis, dass humane Antikörper für das murine Immunsystem körperfremde Antigene darstellen, muss man davon ausgehen, dass Mäuse, denen IVIG injiziert wird eine immunologische Abwehrreaktion gegen diese körperfremden Antigene generieren. Dies führt potentiell dazu, dass Antigen-Antikörper-Komplexe ausfallen und somit nicht an der zu untersuchenden Reaktion teilhaben. Außerdem wäre es denkbar, dass die immunologische Reaktion eine Änderung des Verhaltens hervorruft, welche fälschlicherweise als therapeutische Reaktion fehlgedeutet werden könnte bzw. diese verfälscht.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurde C57/B6J-Mäusen wöchentlich 400µg IVIG über eine Dauer von 12 Wochen intraperitoneal injiziert. Es konnte eine signifikante MAHA-Reaktion auf das humane Immunglobulin G gemessen werden. Es kam zu einem signifikanten Anstieg der MAHA-Reaktion in Woche 9. Eine Änderung in grundlegendem Erkundungs- und Ängstlichkeitsverhalten sowie Kognition konnte nicht begleitend beobachtet werden. Hier belegen wir, dass die Behandlung von Mäusen mit IVIG zwar zu einer erhöhten MAHA-

Reaktion ab Woche 10 führt jedoch ohne begleitende Änderung im Verhalten der Mäuse.

Resultierend ist es möglich, pharmakologische und immunologische Aktivität sowie die therapeutische Effizienz von IVIG in Tiermodellen über eine Zeitspanne entsprechend unserer Versuchsdauer zu untersuchen. In diesem Zeitraum findet keine nachweisbare Beeinflussung oder Neutralisation therapeutischer Effekte von IVIG durch die MAHA-Reaktion statt.

## Abstract

---

Intravenous Immunglobulins (IVIG) are blood products of pooled human serum, which is used in different inflammatory, autoimmune- or immunodeficiency disorders, especially in experimental research of neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease.

The detailed mode of action is not well known, yet. Therefore preclinical ratings of therapeutic efficiency from IVIG in animal models are needed to understand the mode of action of IVIG *in vivo*. To gain knowledge about this mode of action from IVIG *in vivo*, it is essential to capture the murine reaction of human antibodies (MAHA-reaction) in the animal model. With this knowledge it is possible to subsequently draw conclusions and deduce on therapeutic efficiency and to start biological and tests for cognition processes *in vivo*.

Based on the knowledge that human antibodies are foreign antigens to the murine immune system, it is reasonable to assume that an immunomodulatory reaction is caused with the generation of specific antibodies in mice, which were injected with IVIG. Potentially, there can be a neutralizing effect caused by forming antigen-antibody-complexes. Bound in complexes, the antibodies might not be able to take part in the reaction that is examined. Furthermore, it is possible that the immunological reaction changes the behavior of the tested animals, which can be misinterpreted as a therapeutic reaction or divert this therapeutic reaction.

In this thesis C57/B6J mice were injected weekly with 400µg IVIG intraperitoneal over a period of 12 weeks. There was a significant MAHA-reaction after week 9 without any change in basic behavior like exploratory behavior or fear as well as cognition. It has been demonstrated that a treatment of wild type mice with IVIG over a period of 10 weeks causes a significant MAHA-reaction but does not induce any changes in basic behavior.

Therefore, it is possible to draw conclusions about the pharmacological and immunological activities as well as therapeutic efficiency of IVIG in animal models for periods of an examination over a duration comparable to the one evaluated.

During this period there is no measurable interaction or neutralization of therapeutic effects caused by a MAHA-reaction.

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>AD</i>	Alzheimer Demenz
<i>ANOVA</i>	Analysis of Variance, Varianzanalyse
<i>A<math>\beta</math></i>	Amyloid $\beta$ -Protein
<i>BMFZ</i>	Biomedizinisches Forschungszentrum Marburg, Hans-Meerwein-Straße 2 in D-35043 Marburg
<i>bzw.</i>	beziehungsweise
<i>ELISA</i>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>Fc</i>	Fragment crystallizable /constant, konstantes Fragment
<i>FDA</i>	US Food and Drug Administration
<i>HAHA</i>	Humane anti-humane Antikörper-Reaktion
<i>HAMA</i>	Humane anti-murine Antikörper-Reaktion
<i>H-Ketten, C<sub>H</sub></i>	Heavy chains, schwere Ketten
<i>HRP</i>	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
<i>Ig</i>	Immunglobulin
<i>IL</i>	Interleukin
<i>IVIG</i>	Intravenöse Immunglobuline
<i>L-Ketten, C<sub>L</sub></i>	Light chains, leichte Ketten
<i>mAbs</i>	Monoklonaler Antikörper
<i>MAHA</i>	Murine anti-humane Antikörper-Reaktion

<i>n.d.</i>	Nicht messbar (not detectable)
<i>nAbs-A<math>\beta</math></i>	Natürlich vorkommender polyklonaler Anti-A $\beta$ -Antikörper
<i>NK-Zellen</i>	Natürliche Killerzellen
<i>NMDA</i>	N-Methyl-D-Aspartat
<i>PBS</i>	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
<i>PFA</i>	Paraformaldehyd
<i>POD</i>	Peroxidase, hier: Meerrettichperoxidase
<i>SEM</i>	Standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
<i>TMB</i>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
<i>UAW</i>	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
<i>z.B.</i>	Zum Beispiel
<i>ZNS</i>	Zentrales Nervensystem

# I Einleitung

---

Diese Arbeit untersucht die murine Immunreaktion auf wiederholte intravenöse Injektionen eines Präparates humaner Immunglobuline (IVIG). Dabei wurden sowohl das Serum als auch das Gehirn der Mäuse auf Bildung von murinen anti-humanen Antikörpern (MAHA) untersucht. Des Weiteren wurde mittels dem Openfield- und Y-Maze-Tierversuch untersucht, ob die immunologische Reaktion auf das injizierte IVIG-Präparat Auswirkungen auf das grundlegende Verhalten hat.

Einleitend wird nachfolgend die physiologische Reaktion von Antikörpern im Organismus beleuchtet und Unterschiede zwischen humanem und murinem Immunsystem kurz erläutert.

## 1.1 Immunologischer Hintergrund

### 1.1.1 Molekularstruktur der Immunglobuline

Antikörper sind frei im Serum vorkommende Immunglobuline (Ig), die meist nach Kontakt mit einem Antigen von einem B-Lymphozyten gebildet werden. Sie haben, wie die meisten funktionellen Proteine, eine globuläre Form und stellen einen Teil der humoralen Immunabwehr dar (Clark and Kupper, 2005).

Bei den Wirbeltieren gibt es verschiedene Hauptgruppen von Immunglobulinen. Die fünf wichtigsten sind IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Diese Hauptgruppen werden z.T. in weitere Subklassen unterteilt, wie z.B. IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub>, wobei der Großteil aller Immunglobuline beim Menschen dem Typ IgG<sub>1</sub> angehört (s. Abbildung 1, S. 2).

IgG werden von vielen Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, auf der Oberfläche exprimiert.



### IgG-Anteil in humanem Serum

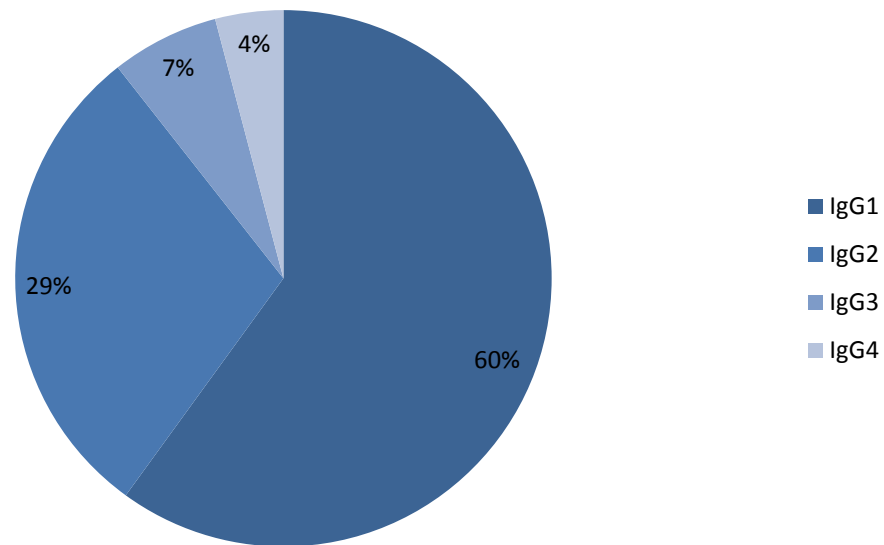


Abbildung 1: Durchschnittlicher Anteil der IgG-Subklassen in humanem Serum in Prozent

Nach (Knezevic-Maramica and Kruskall, 2003)

IgG-Moleküle besitzen die für Antikörper typische Y-förmige Struktur. Sie bestehen aus vier Untereinheiten, von denen immer zwei identisch sind. Eine Untereinheit wird von einer Polypeptidkette gebildet. Dabei unterscheidet man zwischen schweren (heavy chains, H-Ketten) und leichten Ketten (light chains, L-Ketten). Die L-Ketten bestehen aus zwei Immunglobulin-domänen à 110 Aminosäuren und gehören entweder dem  $\kappa$ - oder dem  $\lambda$ -Typ an. Sie bilden den variablen Teil des Antikörpermoleküls. Die H-Ketten bestehen aus zwei identischen schweren Aminosäureketten (heavy chains), die sich aus etwa 430 Aminosäuren zusammensetzen. Sie differenzieren die IgG in ihre Subklassen IgG<sub>1-4</sub> und bilden den konstanten Teil des Immunglobulins, die sogenannten *crystallizable fragment*-Bereiche (Fc-Bereiche). Dieser Fc-Bereich bestimmt die funktionellen Eigenschaften des Ig-Moleküls. Durch diesen Bereich kann IgG mit den Fc-Rezeptoren auf Immunzellen, wie Makrophagen, natürlichen Killerzellen, Monozyten und Faktoren des Komplementsystems binden und interagieren.

Aufgrund ihrer Spezifität spielen die monoklonalen Antikörper, welche gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet sind, in Forschung und Diagnostik u.a. zum Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen eine besondere Rolle.

In dieser Arbeit ist das Hauptaugenmerk auf die IgG<sub>1</sub>-Moleküle gerichtet, da IgG der häufigste Isotyp in humanem Plasma ist. Der allgemeine Aufbau aller Isotypen ist jedoch ähnlich.

### 1.1.2 Das IgG<sub>1</sub>-Molekül

Das IgG<sub>1</sub>-Molekül ist beim Menschen das dominierende Molekül im Serum. Es wird von Plasmazellen in Milz, Lymphknoten und Knochenmark gebildet und kann aus den Blutgefäßen in entzündetes Gewebe einwandern. Dort ist IgG<sub>1</sub> in der Lage, das fremde Antigen zu binden und dies zu opsonieren und agglutinieren.

Das IgG<sub>1</sub>- Molekül besteht aus jeweils zwei identischen H- und L-Ketten und hat eine Molekülmasse von 180kDa (s. auch Abbildung 2, S. 4).

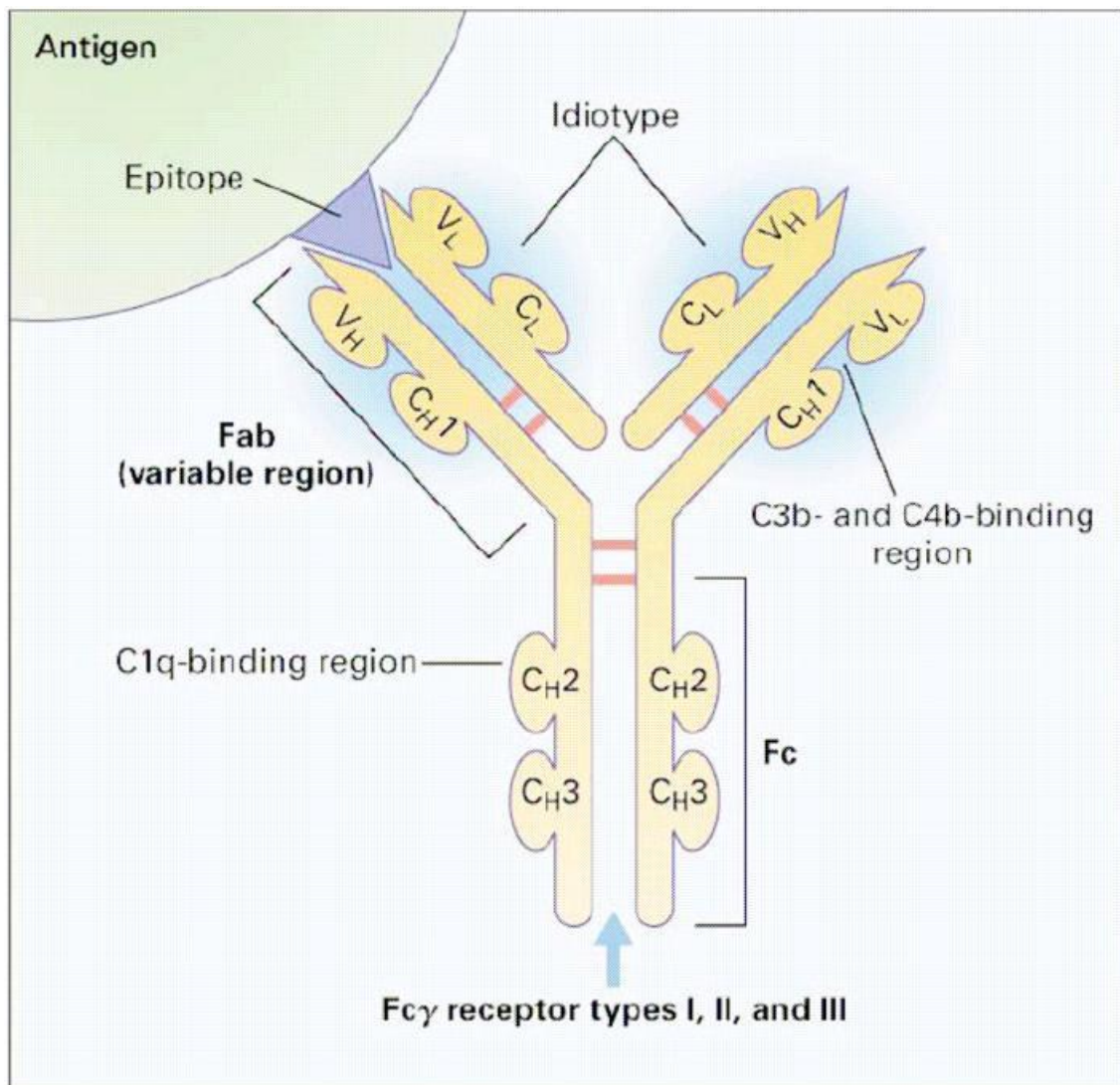


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines IgG-Moleküls und seiner antigenbindenden Regionen

Erkennbar ist der Aufbau aus zwei leichten L-Ketten und zwei schweren H-Ketten, welche zusammen die Antigenbindungsstellen mit einer konstanten Region und einer variablen Region bilden.

Dargestellt sind die Bindungsstellen zwischen IgG und dem Epitop des Antigens über die antigenbindende (Fab)-Region, die Bindungsstellen für den Komplementfaktor C1q (Einleitung des klassischen Weges der Komplementaktivierung) sowie für die aktivierten Faktoren C3b und C4b (Bestandteil des Membranangriffskomplexes) mit den schweren Ketten der IgG und den Fcγ-Rezeptoren (Typ I, II und III).

V: variable Regionen; C: konstante Regionen; H: schwere Ketten (heavy chains); L: leichte Kette (light chains)

Aus: (Kazatchkine and Kaveri, 2001)

## 1.2 IVIG

IVIG (intravenöse Immunglobuline) ist ein Blutprodukt, hergestellt aus gepooltem Plasma von über tausend humanen Spendern. Diese hochdosierten Immunglobulinpräparate umfassen ein repräsentatives Spektrum polyvalenter Antikörper analog zu den Verhältnissen in humanem Serum.

Größter Bestandteil der IVIG-Präparate sind mit >98% die Immunglobuline der Subklasse G (IgG). Die IgG-Subklassenverteilung entspricht der Verteilung im Normalserum (Bayry et al., 2003a, Lemm, 2002, Klaver et al., 2010).

Seit über 30 Jahren wird IVIG zur Plasmaprotein-Ersatztherapie von primären und sekundären Immunmangelsyndromen verwendet. Neuerdings wird IVIG auch zur Therapie von Autoimmunerkrankungen und verschiedenen akut entzündlichen Erkrankungen eingesetzt (Nakamura et al., 2008, Salama et al., 1983). Zur Therapie zugelassen sind die Immunglobulinpräparate von der *US Food and Drug Administration (FDA)* bereits für die Therapie primärer Immundefizienz, idiopathischer thrombozytopenischer Purpura, des Kawasaki-Syndroms, der chronisch lymphatischen B-Zellleukämie, von chronisch-entzündlichen demyelinisierenden Polyneuropathien, bei einer Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus sowie bei Knochenmarkstransplantation. Weiterhin wird IVIG häufig off-Label zur Therapie vieler weiterer Erkrankungen eingesetzt, wie z.B. der AD (Katz et al., 1981, Navarro et al., 2012).

### 1.2.1 Wirkmechanismus von IVIG

Die genauen Wirkmechanismen von IVIG sind noch nicht vollständig entschlüsselt. Es wirkt über verschiedene Effekte, u.a. durch Modulation der Expression und Funktion der Fc- Rezeptoren, Beeinflussung der Komplementaktivierung und des Cytokinhaushaltes, Bereitstellung von anti-idiotypischen Antikörpern und Modulation von B- und T-Zellaktivität (Novak et al., 2012, Kazatchkine and Kaveri, 2001, Bayry et al., 2003b, Nimmerjahn and Ravetch, 2008a, Nimmerjahn and Ravetch, 2008b).

Tabelle 1: Immunregulatorische Effekte von Immunglobulinpräparaten  
 Nach: (Kazatchkine and Kaveri, 2001)

---

Immunregulatorische Effekte von Immunglobulinpräparaten

---

Fc-Rezeptoren

Blockade der Fc-Rezeptoren auf Makrophagen und Effektorzellen

Induktion der antikörpervermittelten Zytotoxizität

Induktion des inhibitorisch wirkenden Fcγ-Rezeptors IIB

Inflammation

Abschwächung des komplementvermittelten Zellschadens

Abnahme der immunkomplex-vermittelten Entzündungsreaktion

Induktion anti-inflammatorischer Zytokine

Hemmung der Aktivierung von Endothelzellen

Neutralisation von mikrobiellen Toxinen

Reduktion des Steroidbedarfs

B-Zellen und Antikörper

Kontrolle des aus dem Knochenmark auswandernden B-Zell-Repertoires

Negative Signalsendungen durch den Fcγ-Rezeptor

Selektive Herunter- und Hochregulation der Antikörperproduktion

Neutralisierung zirkulierender Autoantikörper von Antiidiotypen

T-Zellen

Regulation der Produktion von T-Helferzellen

Neutralisation von T-Zellantigenen

Zellwachstum

Hemmung des Lymphozytenproliferation

Regulation der Apoptose

---

Die immunmodifizierende Wirkung der Immunglobulinpräparate hält zumeist drei bis fünf Wochen an (Kazatchkine and Kaveri, 2001).

Bezüglich der Wirkweise von IVIG steht vor allem der Fc $\gamma$ -Rezeptor als Membranrezeptor des IgG-Isotyps im Fokus. Die konstante Untereinheit der IgG (Fc) bindet an die Fc $\gamma$ -Rezeptoren und bewirkt darüber die Vernichtung von Pathogenen durch die Aktivierung der Phagozyten und Einleitung der Phagozytose sowie durch antikörpervermittelte Zytotoxizität. Weiterhin bewirkt sie die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) über Bindung an den Fc $\gamma$ RIII, welche Antikörper erkennen und die Zielzellen eliminieren.

Die Strukturen des IgG-Moleküls, an denen die unterschiedlichen Wirkmechanismen ansetzen, sind in Abbildung 2, S; 4 gezeigt. Hier sind sowohl die Bindungsstellen zwischen dem Immunglobulin und dem Antigen als auch die Bindungsstellen für die Komplementfaktoren, wie zum Beispiel C3b oder C4b, als Elemente des Membranangriffskomplexes gezeigt.

Zu den Fc-Rezeptor modulierenden Effekten von IVIG zählt auch die Hochregulation der Expression protektiver Fc $\gamma$ RIIB-Rezeptoren mit anti-inflammatorischen Effekten. Diese agieren inhibitorisch und bewirken an Effektorzellen den verringerten Abbau opsonierter Blutplättchen. Die Blockade dieses Rezeptors führt weiterhin zur Reduktion antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität. Diese Eigenschaft wird vor allem als protektiver Effekt bei Demyelinisierung bei neurodegenerativen Erkrankungen genutzt (Kazatchkine and Kaveri, 2001, Bayry et al., 2003b, Nimmerjahn and Ravetch, 2008a, Aschermann et al., 2010).

Ein weiterer anti-inflammatorischer Effekt entsteht durch Vermeidung komplementvermittelter Zytolysen. So verhindert IVIG die Bildung des Membranangriffskomplexes und bindet an die Faktoren C3b und C4b (s. auch Abbildung 2, S. 4), welche durch Opsonierung zur Zytolyse führen. Weiterhin können Immunglobulinpräparate durch eine Beschleunigung des Umbaus des Komplementfaktors C3b in seine inaktive Form eine Zytolyse verhindern. Bindet IVIG an Antigene oder Antikörper, welche in Immunkomplexen vorliegen, so wird die inflammatorische Aktivität des Komplexes vermindert.

Der wesentliche anti-inflammatorische Effekt von Immunglobulinpräparaten ist jedoch die Modulation von Zytokinen und Zytokinantagonisten (Kazatchkine and Kaveri, 2001, Bayry et al., 2003b). In Endothelzellen blockiert IVIG die Produktion von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , welche beide Gene für bestimmte Adhäsionsmoleküle transkribieren, die ebenfalls inflammatorisch wirken.

Ein weiterer neutralisierender Effekt gründet sich in der Komplexbildung der vielen in Immunglobulinpräparaten enthaltenen Autoideotypen mit krankheits-assoziierten oder pathogenen Autoantikörpern.

Weiterhin beinhaltet IVIG einen kontrollierenden Effekt auf B-Zellkolonien, welche aus dem Knochenmark in sekundäre lymphatische Organe auswandern. So können zum Beispiel spezifische autoreaktive B-Zellen herunterreguliert werden (Kazatchkine and Kaveri, 2001).

Welcher Wirkmechanismus entscheidend für die Behandlung einer spezifischen Erkrankung ist, ist bisher nicht geklärt. Hierfür fehlen u. a. noch die Erkenntnisse der genauen Reaktionen von Immunglobulinpräparaten *in vivo* bei gesunden Mäusen zur präklinischen Einschätzung der therapeutischen Effizienz von IVIG in Tiermodellen.

### 1.2.2 Nebenwirkungen der Immunglobulintherapie

Im Allgemeinen sind die unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) der IVIG-Therapie in Art und Ausprägung als mild einzustufen. Sie treten bei ca. 5% der Patienten auf (Kazatchkine and Kaveri, 2001).

Die sofortigen Nebenwirkungen, welche direkt nach der Infusionsgabe erscheinen, sind meist kurzlebig und ähneln der Grippe-symptomatik. Am häufigsten treten Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Schwindel, Fieber, Müdigkeit, Durchfälle sowie Blutdruckschwankungen und Tachykardien auf (Kazatchkine and Kaveri, 2001, Wittstock et al., 2003, Hughes, 2004, Novak et al., 2012). Es wurde jedoch auch über das Auftreten schwerer Nebenwirkungen wie thromboembolischer Komplikationen (u.a. Schlaganfall, Herzinfarkt,

Lungenembolie, periphere Thrombosen), aseptische Meningitis, anaphylaktische Reaktion und akuter Niereninsuffizienz berichtet, welche meistens zu einem späteren Zeitpunkt aufgetreten sind (Kazatchkine and Kaveri, 2001, Pierce and Jain, 2003, Wittstock et al., 2003, Katz et al., 2007, Schenk, 2002, Dodel and Bacher, 2008).

Da unsere Versuchsdauer lediglich zwölf Wochen umfasst, sind keine dieser schwerwiegenden Nebenwirkungen zu erwarten. Die leichten grippeartigen Nebenwirkungen jedoch können als interner Faktor Einfluss auf das Angstniveau und damit ggf. Einfluss auf das Explorationsverhalten haben (Bats et al., 2001, Crawley et al., 1997, Suarez and Gallup, 1981 (August)).

### 1.3 Anti-humane und Anti-murine Antikörperreaktionen

#### 1.3.1 HAMA-Reaktion

Die humanen Anti-Maus Antikörper (HAMA) sind heterophile Antikörper, welche als Immunantwort des menschlichen Körpers auf den Kontakt mit monoklonalen Antikörpern (mAbs) murinen Ursprungs gebildet werden (Hosono et al., 1992, Gruber et al., 2000, Goto et al., 2010).

Murine monoklonale Antikörper mit Spezifität für tumorassoziierte Antigene werden mehr und mehr diagnostisch (beispielsweise zur Immunszintigrafie) sowie therapeutisch (z.B. zur Immunsuppression nach Organtransplantation, zur Unterdrückung von Rejektionskrisen oder akuter Schübe (bei Autoimmunopathien) eingesetzt. Die murinen Antikörper werden im menschlichen Organismus als Antigen erkannt und so führt die Applikation der monoklonalen Maus-Antikörper im Patienten zu einer Immunantwort mit Induktion von polyklonalen HAMA. Diese Antikörper binden mit geringer Affinität sowohl ihr spezifisches Antigen als auch an diverse andere Rezeptoren anderer Substanzen. So kommt es beim Einsatz in der Diagnostik bei Immunoassays, z.B. durch Quervernetzung, zur Maskierung des eigentlichen Ergebnisses. Therapeutisch haben HAMA durch Komplexbildung mit ihrem entsprechenden Antigen eine neutralisierende Wirkung bzw. nehmen nicht an der untersuchten Reaktion teil. Bei zunehmender Therapielänge verstärkt sich die HAMA-Reaktion, so dass es bei wiederholten Dosierungen zur Einschränkung der



therapeutischen Wirkung kommt (Tjandra et al., 1990, Gruber et al., 2000, Oei et al., 2008, Goto et al., 2010, Sevier et al., 1981).

Zur Detektion und zum quantitativen Nachweis dieser HAMA werden seit über zwanzig Jahren erfolgreich ELISAs mit monoklonalen Detektions-Antikörpern eingesetzt (Seccamani et al., 1989, Tjandra et al., 1990, Papoian, 1992, 1993, Kimball et al., 1995, Gruber et al., 2000), (Klee, 2000, Thorpe et al., 2003, Azinovic et al., 2006, Goto et al., 2010, Koshida et al., 2010, Sevier et al., 1981). Um die Immunreaktion gegen therapeutisch und diagnostisch eingesetzte murine Antikörper zu vermeiden, sind die mAbs heute fast alle humanisiert. Ein minimales immunogenes Restpotential bleibt jedoch und so konnten analog in einigen Fällen eine humane anti-humane Antikörperreaktion (HAHA) nachgewiesen werden (Nechansky, 2010). Eingesetzt werden diese humanen Antikörper zum Beispiel zur passiven Immuntherapie von Krebserkrankungen (Szolar et al., 2006).

### 1.3.2 MAHA-Reaktion

Vergleichend zur HAMA-Reaktion ist auch eine murine anti-humane Antikörper-Reaktion (MAHA-Reaktion) nachweisbar. MAHA haben eine Spezifität für humane Immunglobuline und so initiiert eine IVIG-Injektion eine murine Immunreaktion auf das Fremdprotein: Es kommt zur Ausbildung anti-humaner Antikörper. Diese MAHA interagieren vermutlich mit humanen Antikörpern, welche in murinen Tiermodellen gegen diverse Erkrankungen getestet werden und neutralisieren ggf. die therapeutischen Effekte (Loeffler et al., 2012). Das Ausmaß der MAHA-Reaktion ist weitgehend abhängig von Dosis, Therapiedauer, Applikation sowie von vorherigem Kontakt zu humanen Immunglobulinen. Die Reaktion selbst entsteht wenige Tage nach der IVIG-Gabe. Trotz vieler Gemeinsamkeiten gibt es bisher nur drei Veröffentlichungen, die sich mit diesem Thema befassen (Dass et al., 2014, Imboden et al., 2001, Loeffler et al., 2012).

Auch wenn nur wenige präklinische Daten zur MAHA-Antwort bekannt sind, so wird IVIG dennoch in diversen Tiermodellen für *in vivo*-Modelle eingesetzt (Ephrem et al., 2008, Olivieri et al., 2010).

Die MAHA-Reaktion wurde bereits im Vorfeld von Imboden und Murphy et al. beschrieben. Sie stießen auf eine Abnahme eines murinen Antikörpers nach Gabe eines humanisierten Immunglobulins und detektierten ab dem vierten Tag eine MAHA-Reaktion mittels ELISA an 23 Mäusen (Imboden et al., 2001). Imboden und Murphy quantifizierten diese MAHA-Reaktion über einen MAHA-ELISA, welcher als Vorlage zum MAHA-ELISA dieser Versuchsreihe dient.

Neuste Erkenntnisse wurden 2012 von Loeffler et al. veröffentlicht. Über einen Zeitraum von sechs Wochen wurden 27 männliche C57B6/J-Mäuse wöchentlich mit IVIG behandelt und ebenfalls deren MAHA-Reaktion mittels dieses ELISA quantifiziert. Auch in dieser Versuchsreihe konnte bei immunkompetenten Mäusen nach 5-6 Tagen eine Immunantwort mit MAHA nachgewiesen werden (Loeffler et al., 2012).

#### 1.4 Unterschiede im Immunsystem zwischen Mensch und Maus

Das Immunsystem von Mensch und Maus unterscheidet sich u.a. durch die Rezeptorexpression sowie den Immunglobulinsubtypen. Während der im Versuch eingesetzte Stamm von C57/B6J-Mäusen die Immunglobulinarten IgA, IgD, IgE, IgM und IgG mit folgenden Subtypen IgG<sub>1,2b, 2c, 3</sub> produziert, exprimiert der Mensch hingegen IgA<sub>1 und 2</sub>, IgD, IgE, IgM sowie IgG<sub>1-4</sub> (Haley, 2003, Mestas and Hughes, 2004, Aschermann et al., 2010).

Auch wenn verschiedene IgG-Subtypen verschiedene Bindungsmöglichkeiten oder Komplementaffinitäten haben, besteht in dieser Hinsicht kein signifikanter Unterschied zwischen den Immunreaktionen. Es bestehen allerdings Unterschiede in den Möglichkeiten des Klassenwechsels. So induziert Interleukin (IL)-4 in der Maus IgG<sub>1</sub> und IgE, wohingegen beim Menschen die Expression von IgG<sub>4</sub> und IgE induziert wird. IL-13 bewirkt auf humane B-Zellen einen Wechsel zu IgE, während in der Maus keine derartige Wirkung beobachtet wird. Neben verschiedenen IgG-Subtypen werden von Mensch und Maus folglich auch verschiedene Fc-Rezeptoren exprimiert. Der Mensch exprimiert IgG-Rezeptoren, welche in der Maus nicht gefunden werden. Auch der FcαRI-Rezeptor, ein wichtiger humaner IgA-Rezeptor, wird in der Maus nur in geringerem Umfang gefunden. Auch die Fc-Rezeptoren der natürlichen Killerzellen werden

beispielsweise beim Menschen deutlich stärker aktiviert als bei der Maus (Haley, 2003).

Es bestehen weitere Unterschiede an B-Zellrezeptoren, auf die nicht weiter eingegangen wird. Zu T-Zellen, deren Rezeptoren und Mediatoren sei angemerkt, dass in der Maus IL-10 nur von der TH1-Zelle, im humanen Immunsystem jedoch gleichzeitig von TH1- und TH2-Zellen produziert werden kann. Dies kann bei gleichem Krankheitserreger zu verschiedenen Reaktionen führen, was bei diesem Versuchsansatz weniger von Bedeutung ist (Mestas and Hughes, 2004).

Tabelle 2: Vergleich der Immunglobulinklassen verschiedener Spezies

Diese Tabelle vergleicht die Immunglobulinklassen von verschiedenen Tiergattungen. Aus ihr wird die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem murinen und humanen Immunsystem deutlich.

nach (Haley, 2003)

Immunglobulinarten verschiedener Tiergattungen					
Gattung	IgG	IgM	IgE	IgA	IgD
Mensch	IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>3</sub> , IgG <sub>4</sub>	+	+	IgA <sub>1</sub> , IgA <sub>2</sub>	+
Nichtmensc hlicher Primat	+	+	+	+	
Hund	IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub>	+	+	+	
Kaninchen	+	+	+	+	
Hamster	IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub>	+		+	
Ratte	IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2a</sub> , IgG <sub>2b</sub> , IgG <sub>3</sub> , IgG <sub>4</sub>	+	+		+
Maus	IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2a</sub> , IgG <sub>2b</sub>	+	+	+	
Meerschwei n	IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub>	+	+	+	

### 1.5 Fragestellung

Aktuell wird IVIG mehr und mehr im Bereich der Therapieforschung, besonders von neurodegenerativen Erkrankungen, wie u.a. der AD eingesetzt. Hier wurde bereits eine klinische Phase III Studie durchgeführt, in der Patienten mit leichter bis mittelschwerer AD über 24 Wochen ein IVIG-Präparat in verschiedenen

Dosierungen injiziert wurde. In dieser derzeit größten Studie zur IVIG-Therapie in AD Patienten zeigte sich in einem Beobachtungszeitraum von 24 Monaten, dass die IVIG-Therapie ein sicheres Anwendungsprofil hat (Baxter et al., 1995). Ein positiver Effekt auf das Gedächtnis konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Relkin et al., 2009).

Anlass für diese Studien war die Erkenntnis, dass natürlich vorkommende Autoantikörper gegen das Amyloid  $\beta$ -Protein (nAbs-A $\beta$ ) sowohl im Serum als auch im Liquor gesunder Menschen enthalten sind (Du et al., 2001, Weksler et al., 2002). Das Amyloid  $\beta$ -Protein (A $\beta$ ) im Serum und Liquor ist ursächlich für die Entstehung der Amyloidplaques, welche ein pathognomonisches Merkmal der AD sind. Weitere Studien belegen, dass die Level dieses Autoantikörpers bei AD-Erkrankten nachweislich erniedrigt sind (Neff et al., 2008, Dodel et al., 2004, Dodel et al., 2002, Mengel et al., 2013, Weksler et al., 2002, DeMattos et al., 2002). Therapeutische Ansätze mit aktiver und passiver Immunisierung mit A $\beta$ -Antikörpern brachten in Tierversuchen deutliche Erfolge. In der klinischen Erprobung in Phase II mussten zum Teil hingegen, wegen massiver Nebenwirkungen, einige Versuche vorzeitig abgebrochen werden (Schenk, 2002, Bard et al., 2000, Schenk et al., 1999, Morgan et al., 2000, Kotilinek et al., 2002, Gilman et al., 2005).

Die Entdeckung von nAbs-A $\beta$  in IVIG-Präparaten erbrachte somit eine neue Therapieoption. In Tierversuchen konnte bereits ein positiver Effekt auf die Kognition beobachtet werden (Mengel et al., 2013, Istrin et al., 2006, Dodel et al., 2004, Klaver et al., 2010). Sowohl im Tier als auch in Pilotstudien am Menschen konnten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet werden (Dodel et al., 2013).

Da IVIG bereits in diversen anderen Studien mit transgenen Tiermodellen eingesetzt wurde (Huang et al., 2010, Magga et al., 2010, Blank et al., 2007a, Tjandra et al., 1990) und aktuell hinsichtlich neuer Anwendungsgebiete untersucht wird, ist im Hinblick auf die bekannte HAMA-Reaktion eine Kenntnis über die MAHA-Reaktion in Wildtyp C57/B6J-Mäusen unerlässlich für weitere Versuchsplanungen sowie für die Interpretation der gewonnenen Daten. So stellt sich die Frage nach Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen mit MAHA und

der damit verbundenen Änderung bzw. Neutralisierung des therapeutischen oder diagnostischen Effekts.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Effekte einer elfwöchigen Behandlung weiblicher C57/B6J-Mäusen mit wöchentlich 400µg IVIG intraperitoneal (i.p.) untersucht werden. Bereits seit mehreren Jahren ist bekannt, dass das murine Immunsystem gegen humane Immunglobuline eine Immunantwort generiert (Loeffler et al., 2012, Imboden et al., 2001). Da der genaue Wirkmechanismus noch nicht vollständig entschlüsselt ist, IVIG aber in den letzten Jahren mehr und mehr in den Fokus der Therapieforschung diverser Erkrankungen geraten ist, kam es im Vorfeld der Versuche zur Formulierung folgender Fragestellungen:

1. In welchem Ausmaß wird eine murine Immunreaktion generiert?
2. Ab welcher Behandlungsdauer wird eine murine Immunreaktion generiert?
3. Hat eine IVIG-Behandlung Einfluss auf das grundlegende Verhalten hinsichtlich des vermehrten Einsatzes in neurodegenerativer Therapieforschung?
4. Resultierend daraus die Frage, über welchen Zeitraum kann im Rahmen einer präklinischen Studie mit IVIG behandelt werden, bevor Interaktionsreaktionen entstehen?

## II Material und Methoden

---

Die verwendeten Chemikalien und Medikamente mit Angabe von Konzentrationen, Herstellern und Bezugsquellen sind, ebenso wie die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Kulturmedien, mit den zugehörigen Referenzen tabellarisch am Ende des Kapitels aufgeführt.

### 2.1 Technische Installationen

Im Vorfeld der Versuche wurden die Versuchsaufbauten ordnungsgerecht installiert. Die matt lackierten Apparaturen wurden im Raum ausgerichtet, so dass das vorhandene diffuse weiße Licht des Raumes symmetrisch von oben auf die jeweiligen Versuchsfelder fiel. So wurden diese komplett ausgeleuchtet und Schattenbildung und Reflektionen vermieden, da diese zu Schwierigkeiten bei der Objekterkennung und zu Detektionsfehlern führen können. Der Rearing-Rahmen des Openfields wurde in die Versuchsanordnung integriert und über ein vorgeschaltetes Steuerteil mit dem Computer verbunden. Stromkabel der Apparaturen und Kameras wurden verlegt.

Die CCD-Kameras von TSE Systems für VideoMot 2 wurden vertikal und zentral über den Versuchsfeldern an Metallsäulen montiert, um die Auswirkungen von Schwingungen und Bewegungen zu minimieren, welche bei Kameras mit bodennaher Befestigung beobachtet werden konnten. Die Auswahl des Bildausschnittes, welcher die Apparatur komplett und möglichst groß abbilden sollte, geschah durch exakte Ausrichtung der Kameras anhand der Kugelgelenke und Fokussierung auf die Grundebene der Versuchsanordnung. Die Kameras lieferten die Bildsignale an einen DVD-RAM-Recorder (über den Input der jeweiligen Kamera) für die Aufzeichnung und Wiedergabe des Versuchs. Dieser DVD-Recorder war an einen Videomonitor mit Tastatur geschaltet, so dass über den Computer Steuerung und Einstellungen möglich waren.

Die Software VideoMot2 Programm (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) wurde mittels Handbuch „TSE VideoMot 2 Video activating measuring System Black and White System Operating instructions“ installiert.

Im nächsten Schritt wurden die Versuchseinstellungen vorgenommen. Zuerst wurden die reellen Apparaturgrößen mit dem Bildausschnitt kalibriert und die zu

untersuchenden Bereiche als Versuchsregionen in den einzelnen Versuchsanordnungen festgelegt und gespeichert.

Zur weiteren Konfiguration der Messmodi gehörte unter anderem die Festlegung der Werte zur Objekterkennung und -identifizierung mittels Dreipunktdetektion und Differenzverfahren. So wurden anhand von vorangegangenen Probelaufen mit C57/B6J-Mäusen außerhalb der Versuchsgruppen der Objektfilter mit dem Schwellenwert zur Objekterkennung, minimale und maximale Objektfläche, Mindestbreite und -höhe zur Objektidentifikation sowie die Messpausen festgelegt. Ebenso wurden Höhe und Dauer des Aufrichtens definiert.

Vor jedem Versuch wurde eine Hintergrundberechnung durchgeführt, bevor die Maus mittig im Käfig abgesetzt wurde. Es wurden die Messzeiten mittels Autostop (automatisches Anhalten der Kameraaufzeichnung und Objektregistrierung) festgesetzt: 20 Minuten für das Openfield und 10 Minuten für das Y-Maze, um bei allen Mäusen eine gleiche Versuchsdauer zu garantieren.

Mittels dieses Aufbaus war es möglich, Videos der Versuche per DVD-Recorder zu speichern und wiederzugeben. Zur Auswertung der Versuche konnten die Aufzeichnungen der gelaufenen Wegstrecken zusätzlich als sogenannte *Trackfiles* (Spur) aufgerufen und in verschiedenen Geschwindigkeiten abgespielt werden.

## 2.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Für *in vivo* Experimente bezüglich des humanen Immunsystems werden vornehmlich Mäuse verwendet, da sich die grundsätzlichen Strukturen der Immunsysteme von Maus und Mensch sehr ähneln (s. auch Tabelle 2, S.13).

### 2.2.1 Die C57/B6J-Maus

Im Jahre 1921 paarte Dr. C.C. Little, ein US-amerikanischer Genetiker, die Geschwistertiere „Weibchen 57“ und „Männchen 53“ des Bestandes von Miss Abby Lathrop, einer Nagetierzüchterin. So entstand unter anderem der Stamm der C57/B-Mäuse. Seit 1935 gibt es den Unterstamm der C57/B6 Maus, welche eine gute Zuchtleistung aufweist. Die C57/B6J-Mäuse gelten als robust, pflegeleicht und langlebig, mit wenig kongenitalen Anomalitäten oder Tumorwachstum. Die



ehemaligen Laboratorien von C.C. Little in Bar Harbor sind heute noch bekannt als Jackson Laboratories, die größte Bezugsquelle von Inzuchtmäusen auf der Welt.

Der C57B/6J-Stamm ist eine vielseitige Zuchtlinie mit einer hohen lokomotorischen Grundaktivität, die zudem über eine gute Gedächtnis- und Lernleistung verfügt und ein geringes an Angst gekoppeltes Verhalten hat (Johnston and File, 1991, Dvorkin et al., 2008). Dieser Stamm ist die Standardinzuchtlinie für Verhaltensbeobachtungen in der experimentellen Medizin und besonders gut geeignet für Versuchsreihen, in denen eine Abnahme der lokomotorischen Aktivität erwartet wird (Crabbe, 1986, Crawley et al., 1997, Deacon, 2006, Frye et al., 2004). Dieser standardmäßige Einsatz bietet darüber hinaus die Voraussetzung und Grundlage für die Vergleichbarkeit mit anderen Studien (Crawley et al., 1997).

Die weiblichen Versuchstiere zeichnen sich durch höhere lokomotorische Grundaktivitäten gegenüber ihren männlichen Artgenossen aus, bei denen postpubertär noch eine zusätzliche Abnahme dieser Aktivitäten beobachtet werden kann (Johnston and File, 1991, Kastenberger et al., 2012, Morgan and Pfaff, 2001, Frye et al., 2004). Da bekanntermaßen die männlichen Mäuse aggressiver sind als nicht-schwangere und nicht-laktierende Weibchen, welche sich nur höchst selten gegenseitig angreifen, wurden auch im Hinblick auf die Haltung in Fünfer-Gruppen ausschließlich Weibchen für diese Studie ausgewählt (Gangrade and Dominic, 1984, Lathe, 2004). Gruppen mit jeweils fünf Versuchstieren sind ausreichend groß, um große Anomalitäten in der Messung der Bewegung auszuschließen. Die Bildung größerer Versuchsgruppen war aufgrund des Versuchsablaufs nicht möglich.

Die Versuchstiere wurden entsprechend staatlicher Regelungen und den gültigen EU-Richtlinien in den tierexperimentellen Einrichtungen des BMFZ der Phillips-Universität Marburg gehalten. Für die dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchsreihe wurden 110 weibliche C57/B6J-Mäuse verwendet, die von den Charles River Laboratories International, Inc. (Wilmington, North Carolina, USA) bezogen wurden.

Die 110 weiblichen C57/B6J-Mäuse wurden in 22 Fünfergruppen aufgeteilt und in Makrolonkäfigen Typ III mit einer Fläche von 820 cm<sup>2</sup> gehalten. Diese Käfige verfügen über einen Drahtdeckel mit Futterraufe und einer Tränkeflasche, so dass der freie Zugang zu Futter (LASQdiet®Rod16, Rad (bestrahlt), Soest/Westfahlen, Deutschland) und Wasser *ad libitum* über den gesamten Versuchszeitraum gewährleistet war. Die räumlichen Umgebungsbedingungen entsprachen den geltenden Standards. Es herrschte eine Raumtemperatur von 22°C (± 2°C), ein Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden (hell von 6:00 bis 18:00 Uhr) und eine Luftfeuchtigkeit von 50-55%.

### 2.2.2 Behandlung

Die 110 Mäuse wurden in zwei gleich große Behandlungsgruppen aufgeteilt. Über den Versuchszeitraum von elf Wochen wurde eine Gruppe (n=55) mit einer 5%-igen IVIG-Lösung behandelt, während die zweite als Kontrollgruppe (n=55) diente und das Solvens (Phosphatgepufferte Salzlösung, PBS) injiziert bekam. Zu Beginn der Versuche waren die Mäuse neun Wochen alt.

Zunächst wurde die IVIG-Stocklösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml im Verhältnis 1:25 mit PBS verdünnt. Die Injektionen dieser IVIG- Lösung erfolgten mittels einer Sterican Insulin 12mm-Kanüle alle sieben Tage i.p. in den rechten unteren Quadranten. Es wurden alle Tiere der Versuchsgruppe auf diese Art behandelt. Bei einer wöchentlichen Injektion von 0,2ml der Lösung betrug die IVIG-Dosis 400µg pro Woche. PBS wurde mengenäquivalent und in gleicher Vorgehensweise der Kontrollgruppe verabreicht.

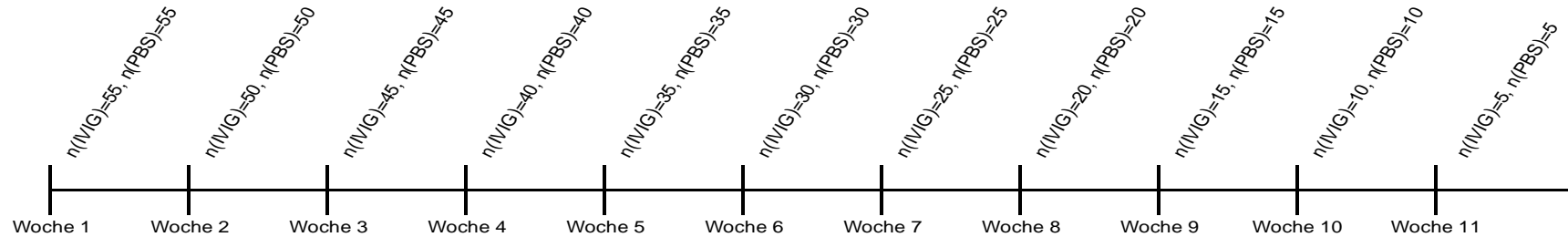


Abbildung 3: Behandlungsablauf der C57/B6J-Mäuse

Die insgesamt 110 Mäuse wurden aufgeteilt in eine Behandlungsgruppe (IVIG-Injektion) und eine Kontrollgruppe (PBS-Injektion). Jeweils am ersten Tag der Woche bekamen alle verbliebenen Mäuse eine Injektion. An Tag 7 der jeweiligen Wochen wurden die Versuche an je 5 Tieren/Gruppe durchgeführt, so dass jede Woche insgesamt 10 Mäuse aus den Behandlungsgruppen ausschieden. Die Behandlungsdauer betrug 11 Wochen.

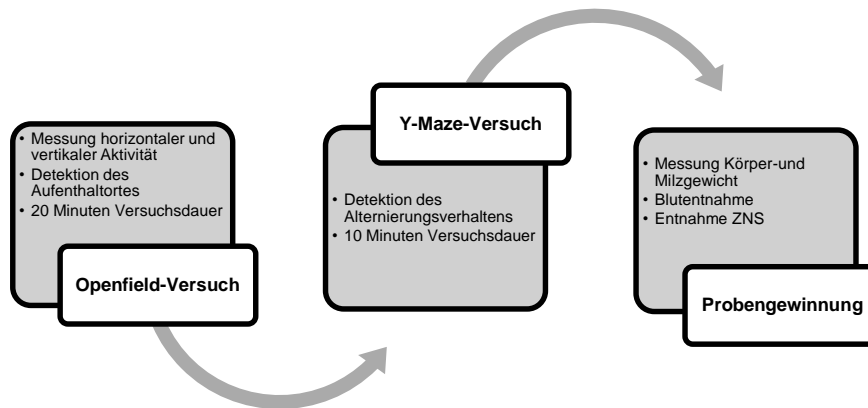


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der Verhaltensversuche und der Probengewinnung.

Je Gruppe wurden 5 Tiere untersucht, zunächst 20 Minuten im Openfield-Versuch, nach einer Pause von mindestens 30 Minuten 10 Minuten im Y-Maze. Nach Durchlaufen der Versuchsapparaturen wurden an Tag 7 jeder Woche der 11 Wochen Versuchsdauer die Messungen des Körpergewichts und die letale Probengewinnung durchgeführt.

## 2.3 Verhaltensversuche

Alle Tierversuche wurden verantwortungsvoll und gemäß der Richtlinien des Tierschutzgesetzes (TierSchG Abschnitt 5 von 2006; zuletzt geändert 2010; Erstfassung 1972) und unter Abwägung des medizinischen Nutzens durchgeführt. Die Durchführung aller Verhaltensversuche fand im Verhaltenslabor des BMFZ statt, in welchem eine dem Standard entsprechende konstante Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Helligkeit herrschte (Regierungspräsidium Gießen: Genehmigung Tierversuchsvorhaben V-54 - 19 c 20-15 (1), Ordnungsnummer 06 / 2008).

In dieser Versuchsreihe kamen zwei Verhaltensversuche zum Einsatz, das Openfield und das Y-Maze. Sechs Tage nach i.p. Injektion der IVIG- bzw. der Kontrolllösung wurden die Verhaltensversuche durchgeführt. Begonnen wurde mit dem Openfield, anschließend wurde der Y-Maze-Versuch durchgeführt. Zwischen den beiden Verhaltensversuchen lag jeweils ein Abstand von mindestens 30 Minuten.

Registriert und ausgewertet wurden die Verhaltensprotokolle von VideoMot2 Programm (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland).

### 2.3.1 Das Openfield

Das Openfield ist die am häufigsten angewandte, standardisierte Apparatur zur Darstellung und Bewertung von Erkundungs- und Vermeidungsverhalten bei Labormäusen (Crawley, 1985, Bronikowski et al., 2001). In diesem Versuchsaufbau wird das Explorationsverhalten untersucht, also die natürliche Bereitschaft von Mäusen neue Gebiete zu erkunden. Eine unbekannte Umgebung initiiert aufgrund der natürlichen Neugierde eine motorische Aktivität mit gesteigerter horizontaler Fortbewegung und vermehrtem Aufrichtverhalten. Grundlage des Openfield-Versuchs ist die Arbeitshypothese, dass das Versuchstier auf der freien Fläche der Versuchsaapparatur einen Interessenkonflikt zwischen Erkundungs- und Fluchttrieb erlebt. Die natürliche Neugier der Nager, neue Gebiete zu erschließen, dient der positiven Verstärkung des Erkundungstriebes, während die Angst auf einer offenen Fläche potentiellen Feinden ausgeliefert zu sein, den Fluchttrieb aufrecht erhält.

Um dieses Erkundungs- und Vermeidungsverhalten zu beurteilen, wird die lokomotorische Aktivität der Tiere gemessen. Sie zählt zu den instinktiven Verhaltensweisen von Mäusen, dient der Orientierung und Informationssammlung und ist somit in einer neuen unbekannten Umgebung besonders ausgeprägt. Neben der horizontalen ist auch die vertikale Aktivität, das sogenannte Aufrichtverhalten zu erwähnen, welche den Nagern evolutionsbiologisch dazu dient, eine Übersicht über die naheliegende Umgebung zu erhalten. Um Rückschlüsse auf die lokomotorische Aktivität zu gewinnen, werden also verschiedene Bewegungsmerkmale, wie die gelaufene Wegstrecke, die Aufenthaltsorte und das Aufrichten herangezogen (Roth and Katz, 1979, Crawley et al., 1997).

Einfluss auf die lokomotorische Aktivität haben sowohl Emotionen, wie zum Beispiel Angst als interner Faktor, als auch externe Faktoren. Erhöht man beispielsweise die Helligkeit oder die Umgebungsgeräusche, so reduziert sich die lokomotorische Aktivität (Crawley et al., 1997).

Vorherige Studien haben gezeigt, dass in einer unbekannten Umgebung das murine Angstniveau initial gesteigert ist und es zu vorsichtigem Explorationsverhalten kommt. Nach gewisser Zeit gewöhnen sich Mäuse an ihre Umgebung (Habituation) und das Angstniveau sinkt (Dvorkin et al., 2008). Es kommt zu gesteigertem Explorationsverhalten und einer vermehrten Anzahl von Eintritten in die ungeschützte zentrale Region. Wenn genügend Informationen gesammelt wurden, nimmt das Explorationsverhalten wieder ab.

Steigt jedoch aufgrund interner oder externer Faktoren das Angstniveau, kommt es zur Abnahme der motorischen Aktivität, einem verminderten Aufrichtverhalten und zu einer erhöhten Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Randbereich der Versuchsanordnung (Liebsch et al., 1998, Katz et al., 1981, Crawley, 1985).

#### 2.3.1.1 Versuchsanordnung

Die Versuchsanordnung des Openfield (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) bestand aus vier Polypropylen-Boxen, die über einen Aluminiumrahmen fest miteinander verbunden waren. In den Rahmen war ein Rearing-Indikator eingearbeitet, welcher per Infrarotschranke das

Aufrichtverhalten der Mäuse registrierte. Für unsere Versuche wurden aufgrund der Kameraposition allerdings lediglich zwei Boxen parallel genutzt.

Jede Box hatte eine Grundfläche von 50 x 50cm, umgeben von 30cm hohen Wänden. In jeweils zwei gegenüberliegenden Wänden je Box waren 32 Infrarot-Lichtschrankenpaare in einer Höhe von 6,5cm mit einem Abstand von jeweils 1,5cm installiert. Diese dienten der Registrierung von vertikalen Bewegungen der Versuchstiere (s. Abbildung 5, S. 24). Zeitliche Begrenzung für die Messung der vertikalen Aktivität waren hier eine minimale Dauer von 100ms und eine maximale Dauer von 200ms. Die 2500cm<sup>2</sup> große Grundfläche der Käfige wurde unterteilt in zwei Regionen. Zum einen in eine quadratische innere Fläche mit einer Größe von 400cm<sup>2</sup> (Zentrum), zum anderen die umgebende äußere Fläche, welche die innere Fläche vollständig umschloss (Peripherie). Diese umgebende äußere Fläche umfasste eine Größe von 2100cm<sup>2</sup> (s. auch Abbildung 6, S. 25). Die Boxen waren hellgrau und bildeten einen guten Kontrast zu den schwarzen C57/B6J-Mäusen, so dass sich ein Schwellenwert von 220 ergab. Die Versuchstiere wurden per Dreipunktdetektion erkannt und registriert. Aufgezeichnet wurde dies von einer Kamera, die 221cm über dem Käfigboden befestigt war.

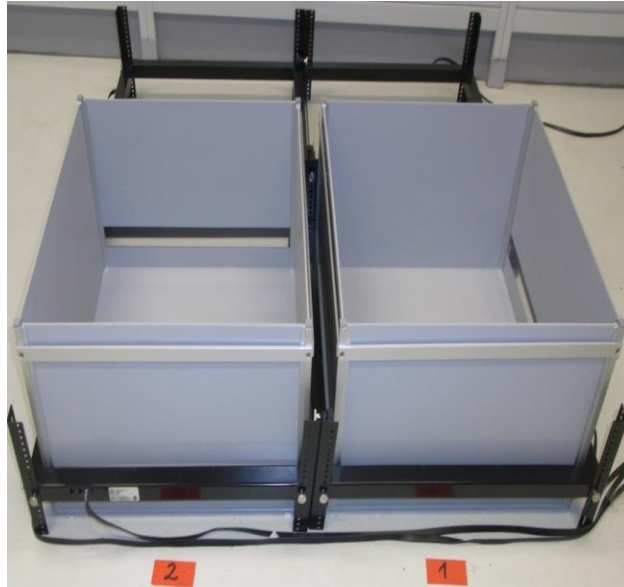


Abbildung 5: Versuchsanordnung des Openfields zur Messung der lokomotorischen Aktivität.

Sie wird gebildet von zwei hellgrauen Versuchsboxen mit Plexiglas-Einsätzen im Bereich der Infrarotsensoren an je zwei gegenüberliegenden Wänden.

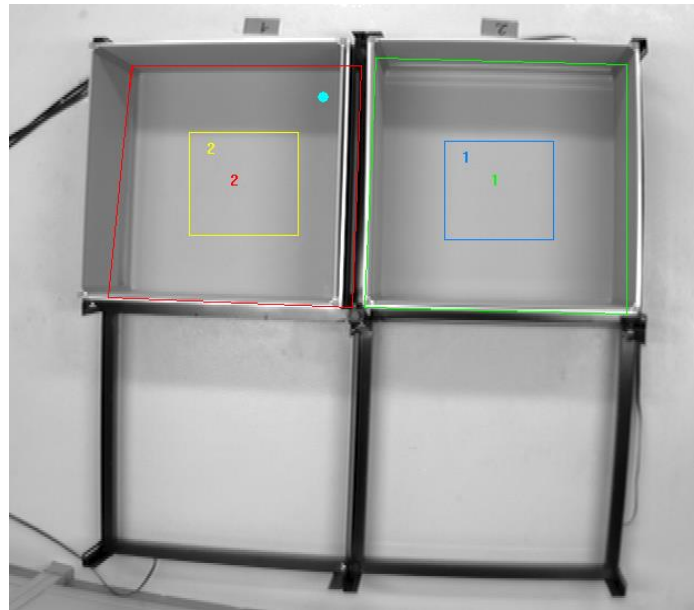


Abbildung 6: Versuchsregionen des Openfield

Diese Abbildung zeigt die Apparatur des Openfieldversuchs von oben. In den zwei benutzten Boxen sind jeweils die im Vorfeld definierten zentralen und die peripheren Regionen eingezeichnet. In Box 1 sind diese jeweils mit einer 1 beschriftet und in Box 2 mit jeweils einer 2. Der Punkt (•) bezeichnet die Detektion einer Maus.

### 2.3.1.2 Versuchsdurchführung

Alle Versuchstiere wurden einzeln zentral und ohne Bewegungseinschränkung in der schattenfrei ausgeleuchteten Box abgesetzt. Die Versuchsleitung verließ den Raum, so dass die Mäuse über eine Zeitspanne von 20 Minuten ohne Beeinflussung von außen beobachtet werden konnten. Alle 100ms wurde per Dreipunktdetektion registriert, in welchem Feld sich das Tier befindet. Sämtliche Ortsänderungen wurden mit der Videokamera aufgenommen und in einem Verhaltensprotokoll (VideoMot2, TSE Systems) registriert. Aufgezeichnet wurden die Laufstrecken, die durchschnittliche Geschwindigkeit, die Aufenthaltsdauer und das Aufrichtverhalten der Mäuse in den jeweiligen Regionen.

Zwischen den einzelnen Versuchen wurde die Openfield-Versuchsapparatur mit 70%igem Alkohol gereinigt um Beeinflussungen der Mäuse durch externe Reize zu verhindern.



### 2.3.1.3 Datenanalyse

Zu einer anschließenden Auswertung wurde die Häufigkeit, mit der die definierten Regionen (Feldmitte, Feldperipherie) aufgesucht wurden, das Aufrichtverhalten und die zurückgelegte Wegstrecke ermittelt.

### 2.3.2 Y-Maze

Das Y-Maze ist ein Verhaltenstest, dessen erste Beschreibung über 30 Jahre zurückliegt. Mittlerweile ist es die geläufigste Methode zur Erfassung des spontanen Alternierungsverhaltens und damit des Arbeitsgedächtnisses sowie des Orientierungsverhaltens von Mäusen (Lalonde, 2002, Hughes, 2004).

Werden Labormäuse in der Y-Maze-Apparatur (s. auch Abbildung 7, S. 27) mittig abgesetzt, so wird beobachtet, dass Mäuse es vorziehen, erst einen neuen Arm als unbekanntes Gebiet zu erkunden, bevor sie den zuvor besuchten Arm erneut betreten. Dies setzt voraus, dass alle Arme gleich beschaffen sind und die Maus von extern nicht beeinflusst wird. Somit sollten die Arme typischerweise in einer sich wiederholenden Reihenfolge abgelaufen werden (Röskam et al., 2010). Das Y-Maze ermöglicht über die Anzahl der Armeintritte eine Bewertung und einen Vergleich der Nager in ihrer räumlichen Gedächtnisleistung (Sarter et al., 1988, Hughes, 2004).

Im zeitlichen Verlauf, wenn genügend Informationen über die Umgebung gesammelt wurden, nehmen die Aktivitäten und damit auch das Alternierungsverhalten wieder ab (Habituation). Beeinflusst wird das Alternierungsverhalten ebenfalls von Emotionen, wie zum Beispiel Angst. So zeigt sich bei einem erhöhten Angstniveau eine Abnahme des spontanen Alternierungsverhaltens und der lokomotorischen Aktivität (Bats et al., 2001, Lalonde, 2002).

#### 2.3.2.1 Versuchsaapparatur des Y-Maze

Die Versuchsaapparatur (TSE Systems, Bad Homburg) war aus hellgrauem PVC gefertigt. Sie hatte die Form eines Ypsilon mit drei identischen Armen im Winkel von jeweils 120° zueinander. Alle Arme hatten eine Länge von 30cm und eine

Breite von 9cm. Umgeben war die Fläche von einer Wand mit einer Höhe von 15cm. In den Armen befanden sich weder Futtermulden noch Türen. Nach oben war die Apparatur nicht verschlossen. Der Versuchsaufbau befand sich auf einer erhöhten Plattform, 78,5cm über dem Boden, die Kamera war 161cm über der Bodenplatte der Apparatur befestigt.

In den drei Armen wurde jeweils eine Fläche von  $24 \times 9\text{cm}^2$  als Versuchsregion definiert und mit 1,2 und 3 benannt (s. Abbildung 7, S. 27). Die Mitte stellte keine Versuchsregion dar, daher wurden bei der Auswertung des Versuchs nur die Flächen (1, 2, 3) der drei Arme berücksichtigt. Die Armeintritte und Ortsänderungen wurden per Videokamera in zeitlicher Abfolge aufgezeichnet und anschließend ausgewertet.

#### 2.3.2.2 Versuchsdurchführung

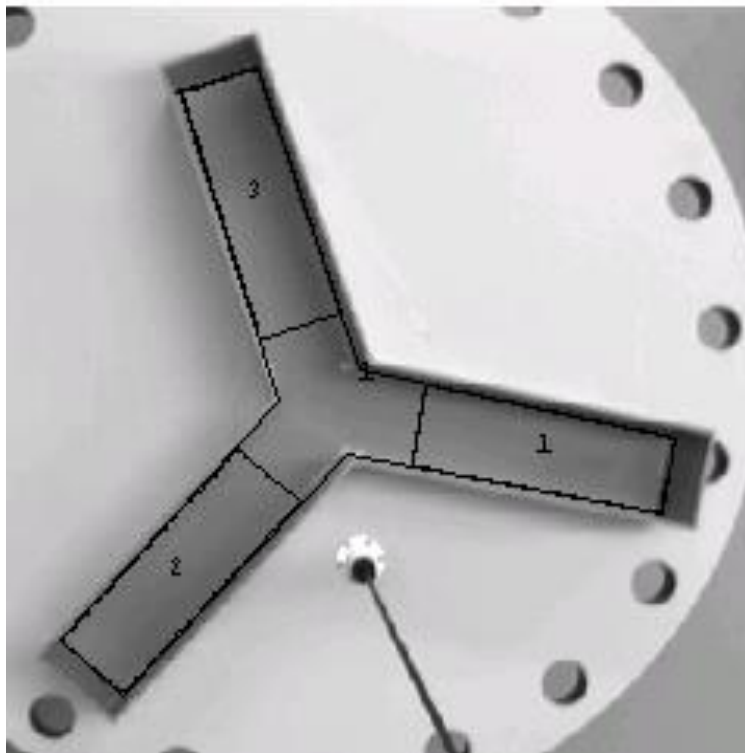


Abbildung 7: Versuchsaufbau des Y-Maze

Versuchsaufbau des Y-Maze mit den markierten Versuchsregionen 1, 2 und 3 in den Armen des Y-Maze. Die Mitte wird nicht als Versuchsregion betrachtet.

Die Lautsprecheinrichtung am unteren Bildrand kam in diesem Versuch nicht zum Einsatz, ebenso wie der Lochstisch auf dem die Apparatur steht. Die Mäuse wurden in der Gabelung der schattenfrei ausgeleuchteten Versuchsaufbau mit freiem Zugang zu allen Armen (*free-choice-procedure*) abgesetzt.

Die Versuchsdauer lag bei zehn Minuten. Bei dieser Apparatur betrug der Schwellenwert 60. Gemessen wurde der Aufenthaltsort der Maus ebenfalls mittels Dreipunkt-Detektion alle 100ms.

Im Verhaltensprotokoll wurden die Häufigkeit der einzelnen Armeintritte, die Strecken und die verbrachte Zeit in den eingeteilten Regionen sowie die Gesamtanzahl der Armeintritte des Versuchstieres aufgeführt. Erfasst, aufgezeichnet und ausgewertet wurde dies mithilfe des VideoMot2 Systems (VideoMot2, TSE Systems).

Nach jedem Durchgang erfolgte auch hier eine Zwischendesinfektion der Apparatur mit einer 70%igen Alkohollösung, um olfaktorische Reize zu eliminieren und eine Beeinflussung der Maus zu verhindern.

#### 2.3.2.3 Datenanalyse

Für die Auswertung wurde bei den Armeintritten zwischen den Eintritten in den zuvor verlassenen Arm („gleicher Arm“), die Eintritte in den vorher aufgesuchten Arm („vorheriger Arm“) und der Eintritt in den neuen, nicht unmittelbar vorherig aufgesuchten Arm („neuer Arm“) unterschieden. Die Anzahl der tatsächlichen Wechselfolgen aller drei Arme nacheinander wurde ins Verhältnis zu den theoretisch möglichen Wechselfolgen aller drei Arme nacheinander gesetzt. Dieses Verhältnis wurde in diesem Test als Indikator für die Güte des Arbeitsgedächtnisses verwendet. Weiterhin wurden die gelaufene Wegstrecke und die durchschnittliche Aufenthaltsdauer in den Armen sowie die Anzahl der Armeintritte ausgewertet.

### 2.4 Probengewinnung

#### 2.4.1 Narkose

Um die Gewebeproben der Mäuse gewinnen zu können, wurden die Versuchstiere zuvor mit einer Ketamin-Xylazin-Narkose betäubt. Diese setzte sich zusammen aus Ketamin 10% (100 mg/ml, Wirkstoff Ketaminhydrochlorid) und Xylazin 2% (20 mg/ml, Wirkstoff Xylazinhydrochlorid).

Die Xylazin-Ketamin-Mischung wurde mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung im Verhältnis 4:1 verdünnt. Ein Milliliter Narkoselösung enthielt somit 1mg Xylazin,

sowie 60mg Ketamin. Den Versuchsmäusen, die die Verhaltensversuche durchlaufen haben, wurden jeweils 0,15ml i.p. injiziert.

Nach fünf bis zehn Minuten Wartezeit hatte sich eine Vollnarkose mit guter Analgesie eingestellt, welche mittels Testung der Reaktion (Stellreflex, Blinkreflex, Schmerzreiz) überprüft wurde. Bei vorhandenem Ausfall der o.g. Schutzreflexe erfolgte sofort im Anschluss die Blut- und Organentnahme, um den Zerfall des Gewebes so gering wie möglich zu halten. Bei nicht ausreichender Betäubung wurde den betroffenen Mäusen vor der Blut- und Organentnahme 0,05ml der Narkoselösung nachinjiziert.

#### 2.4.2 Organentnahme und Probengenerierung

Nach ausreichender Narkotisierung der Mäuse wurde ihr Gewicht mittels einer handelsüblichen Laborwaage bestimmt. Im Anschluss daran erfolgte die Blut- und Organentnahme.

Nach Fixierung der narkotisierten Maus in Rückenlage wurde die Brust- und Bauchhöhle mit einer Schere eröffnet. Zunächst wurde das Diaphragma durchtrennt, der Brustkorb eröffnet und das Herz freigelegt. Die terminale Blutentnahme erfolgte durch offene Punktion des Herzens in den linken Ventrikel und wurde unter Sichtkontrolle mittels einer Insulinkanüle durchgeführt. Es konnten pro Maus 3-5ml Blut gewonnen werden. Dieses wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Nach der anschließenden Zentrifugation (15 Minuten bei 2000g) wurde das überstehende Serum abpipettiert und in Rationen à 100µl separiert. Die gewonnenen Serumproben wurden in Eppendorfgefäßen bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C verwahrt. Im Anschluss an die Blutentnahme wurde die Milz freipräpariert, entnommen und auf Eis gelagert um Zellzerfall und Flüssigkeitsverlust zu minimieren. Um später auf den Immunstatus schließen zu können, wurde das Milzgewicht per Feinwaage ermittelt. Abschließend wurde die Milz verworfen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Präparation der Schädelhöhle. Nach Eröffnung der Kalotte wurde das Gehirn stumpf abpräpariert und entnommen. Die Gehirnhälften wurden entlang der Mittellinie mit einem Skalpell voneinander getrennt. Während die rechten Gehirnhälften direkt nach Entnahme in

Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C verwahrt wurden, wurden die linken Gehirnhälften für 24 Stunden in Paraformaldehyd (PFA) bei 4 °C fixiert. Anschließend erfolgte nach einer Spülung mit MilliQ die Konservierung in Ethanol (>99,8 %).

Das Operationsbesteck wurde zur Keimabtötung nach jeder Entnahme mit einer 70%igen Alkohollösung gereinigt.

Zur weiteren Aufbereitung wurde das bei -80°C tiefgefrorene Gehirngewebe der rechten Hemisphären unter Zugabe von T-PER und Complete im Verhältnis 100:1 bei Raumtemperatur mechanisch homogenisiert, bis ein trübes Lysat entstand. Verwendet wurden hierfür Pistills für die grobe Zerkleinerung und anschließend Pipetten für die feine Zerkleinerung. Die Lysate wurden für mindestens zehn Minuten auf Eis gestellt und dann für weitere zehn Minuten bei 4°C mit 100.000g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und unter Zuhilfenahme des BCA Protein Kits und eines Spektrometers die Proteinkonzentration bestimmt. Nachfolgend wurden die Proben à 100µl separiert und bei -80°C in Eppendorfgefäßen verwahrt.

## 2.5 ELISA zur Bestimmung der MAHA-Antwort

### 2.5.1 Enzyme linked immunosorbent assay

Zur Konzentrationsbestimmung von Biomolekülen, wie z. B. Immunglobulinen, werden bevorzugt enzymgekoppelte Immunoassays angewendet. Sie sind sehr spezifisch und können im optimierten Testsystem Antigene auch bei niedrigsten Konzentrationen nachweisen und quantifizieren. Diese Tests sind leicht in der Handhabung und machen sich das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion zu Nutze. Vor allem beim Durchsatz einer großen Probenanzahl ist der ELISA optimal anzuwenden.

Dem Prinzip dieser Methode liegt der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) zu Grunde. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass ein Enzym chemisch mit einem Antikörper oder Antigen gekoppelt wird. Dabei wird die unmarkierte Komponente an einen festen Träger gebunden, welcher Proteine in gewissem Maße adsorbiert. Bei den meisten heute durchgeführten ELISAs bindet man das Antigen in die Vertiefungen einer

Kunststoffmikrotiterplatte und testet die Anlagerung eines markierten Antikörpers. Die Antigen-Antikörperbindung wird dann, mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion, die ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt, dargestellt. Schließlich wird die Extinktion mit einem Photometer (ELISA-Reader) bestimmt. Bei vielen nicht kompetitiven ELISAs wird mit dem Sandwich ELISA gearbeitet (siehe Abbildung 8, S. 32). Dieses Verfahren wird verwendet, wenn aus einem umfangreichen Proteingemisch ein ganz spezielles Protein detektiert werden soll (Avrameas and Guilbert, 1971b, Avrameas and Guilbert, 1971a, Avrameas and Ternynck, 1971, Bora et al., 2002, Engvall and Perlmann, 1971, Engvall et al., 1971, Gregorius and Theisen, 2001, Murphy et al., 2009, Porstmann and Kiessig, 1992).

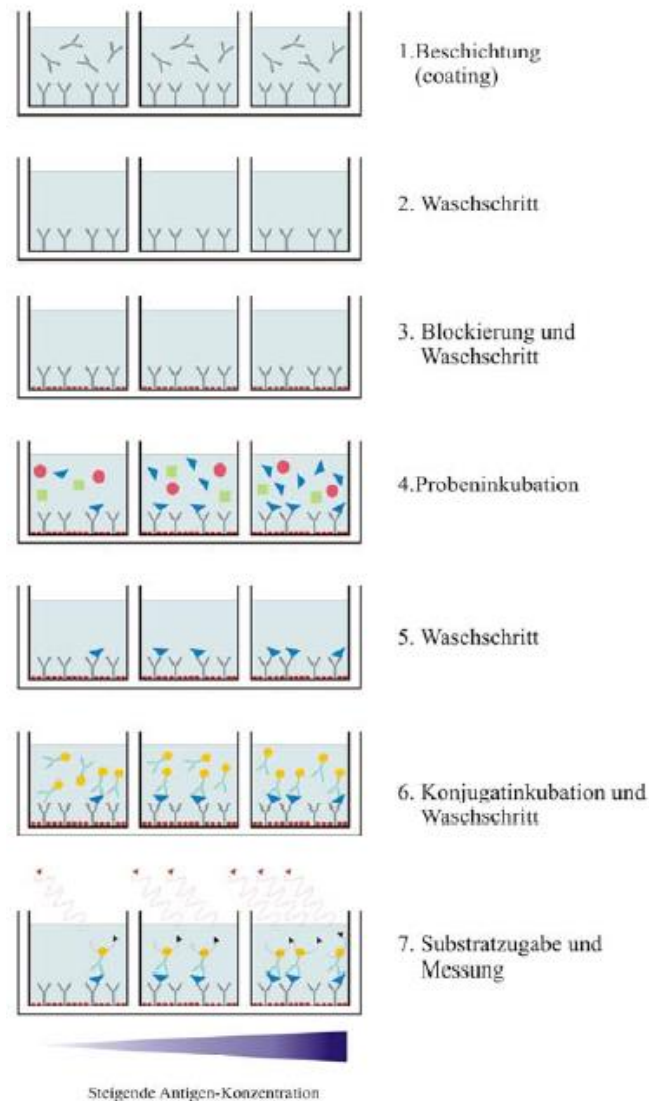


Abbildung 8: Prinzip des Sandwich-ELISA mit kurzer Erläuterung der einzelnen Schritte  
(nach (Kiote-Schmidt, 2007)).

Die Bestimmung der Antigenkonzentration in den Serum- und Gehirnproben erfolgte mittels Sandwich-ELISA, der aktuell am häufigsten verwendete quantitative Immunassay. Alle Waschschriffe wurden mit dem Universalwaschpuffer PBS 0.05 %-Tween 20 (pH 7.4) durchgeführt und bestanden aus jeweils 1x Waschen und 3x Spülen mittels ELISA-Waschgerät.

### 2.5.2 ELISA des Serum

Im ersten Schritt wurde die 96-well-Microtitierplatte aus Polystyrol ge-coated. Es wurde dazu eine 1:1 Lösung von IVIG (Octagam, Octapharma, Deutschland) und PBS mit Coatingbuffer auf eine Konzentration von 1:100 000 verdünnt. Die ELISA-Platten wurden zunächst über Nacht bei 4°C mit 100µl dieser Lösung je well inkubiert.

Nach einem Waschdurchgang im automatischen ELISA-Waschgerät wurden die ELISA-Platten im zweiten Schritt mit je 200µl SuperBlock Blockierungspuffer (Pierce®, Thermo Scientific, Deutschland) pro well beimpft, um die freien Bindungsstellen der Platte unspezifisch zu besetzen. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurden die Überstände mittels ELISA-Waschgerät abgewaschen.

Im dritten Schritt wurden nun die zu untersuchenden Proben aufgetragen. Zunächst wurden zwei Standardreihen mit vorgegebenen Konzentrationen des Antikörpers hergestellt, um später durch photometrische Messung der Farbintensität der einzelnen Konzentrationen eine Eichkurve anfertigen zu können. Für die Standardreihen beim ELISA der Blutseren wurden Stammlösungen mit Mouse-anti-human-Immunglobulin (BD Biosciences Pharmingen, New York, USA) mit den Ausgangskonzentrationen 1:500 und 1:250 erstellt. Diese Stammlösungen wurden in PBS jeweils zehnmal 1:3 fortgesetzt verdünnt. Die Serumlösungen wurden 1:50 in PBS gelöst und für die Dreifachbestimmung in drei Wells à 100µl aufgetragen. Zu Gunsten der Genauigkeit wurden alle Probenmessungen in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die mit Gewebeproben beimpften ELISA-Platten inkubierten über Nacht bei 4°C.

Im vierten Schritt wurden die überstehenden Antikörper im erneuten Waschgang mit dem ELISA-Waschgerät entfernt. Um die Menge der gebundenen murinen Antikörper zu bestimmen, wurde eine Konjugatlösung dazugegeben. Diese bestand aus einem an Meerrettichperoxidase konjugierten monoklonalen Anti-mouse-Immunglobulin (Goat-anti-mouse IgG POX, Calbiochem, Deutschland) 1:10 000 gelöst in Superblock Blockierungspuffer. Nach einstündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Überschuss mit dem ELISA-Waschgerät in einem Waschgang abgewaschen.



Für die abschließende farbbildende Reaktion diente die Peroxidaselösung TMB soluble Pierce® (Thermo Scientific Pierce, Deutschland) als chromogenes Substrat. Nach Zugabe von 100µl TMB soluble je well wurde aufgrund der Lichtempfindlichkeit von TMB soluble für 10-15 Minuten abgedunkelt inkubiert. Die ablaufende Reaktion wurde durch Zugabe von 25µl zweimolarer Schwefelsäure je well abgestoppt.

Die optische Extinktion wurde direkt im Anschluss mittels eines Photometers (Tecan i.control) bei einer Wellenlänge von 450nm ermittelt.

Anhand der Konzentrationsreihe mit vorgegebenen Konzentrationen des Antikörpers (Standardreihe) kann durch die kolorimetrische Ermittlung der Farbintensität der einzelnen Konzentrationen eine Eichkurve angefertigt werden und auf die Antikörperkonzentration in den Gewebeproben rückgeschlossen werden.

### 2.5.3 ELISA des Gehirns

Für die ELISA der entnommenen Gehirnproben wurden die Schritte des Coating und Blocken analog zu den Serum-ELISA durchgeführt.

Im dritten Schritt wurden je well 4mg der ZNS-Proben aufgetragen. Die ZNS-Proben mussten, je nach zuvor gemessener Proteinkonzentration, mit einer Lösung aus T-PER (Pierce®, Thermo Scientific, Deutschland) + Complete (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) 100:1 verdünnt werden. Aufgetragen wurden die Gewebeproben dann à 100µl ebenfalls dreifach 1:50 in T-PER + Complete (100:1) gelöst. Um einheitliche Lösungsmittel zu verwenden, wurde der Standard Mouse-Anti-human-Antikörper ebenfalls in T-PER + Complete (100:1) auf die Konzentrationen 1:250 und 1:500 verdünnt. Mit diesen beiden Standardstammlösungen wurden erneut zwei Standardverdünnungsreihen jeweils zehnmal mit T-PER + Complete (100:1) 1:3 fortgesetzt verdünnt.

Ab Schritt vier sind der Ablauf sowie die Auswertung dann wieder analog zum Serum-ELISA.

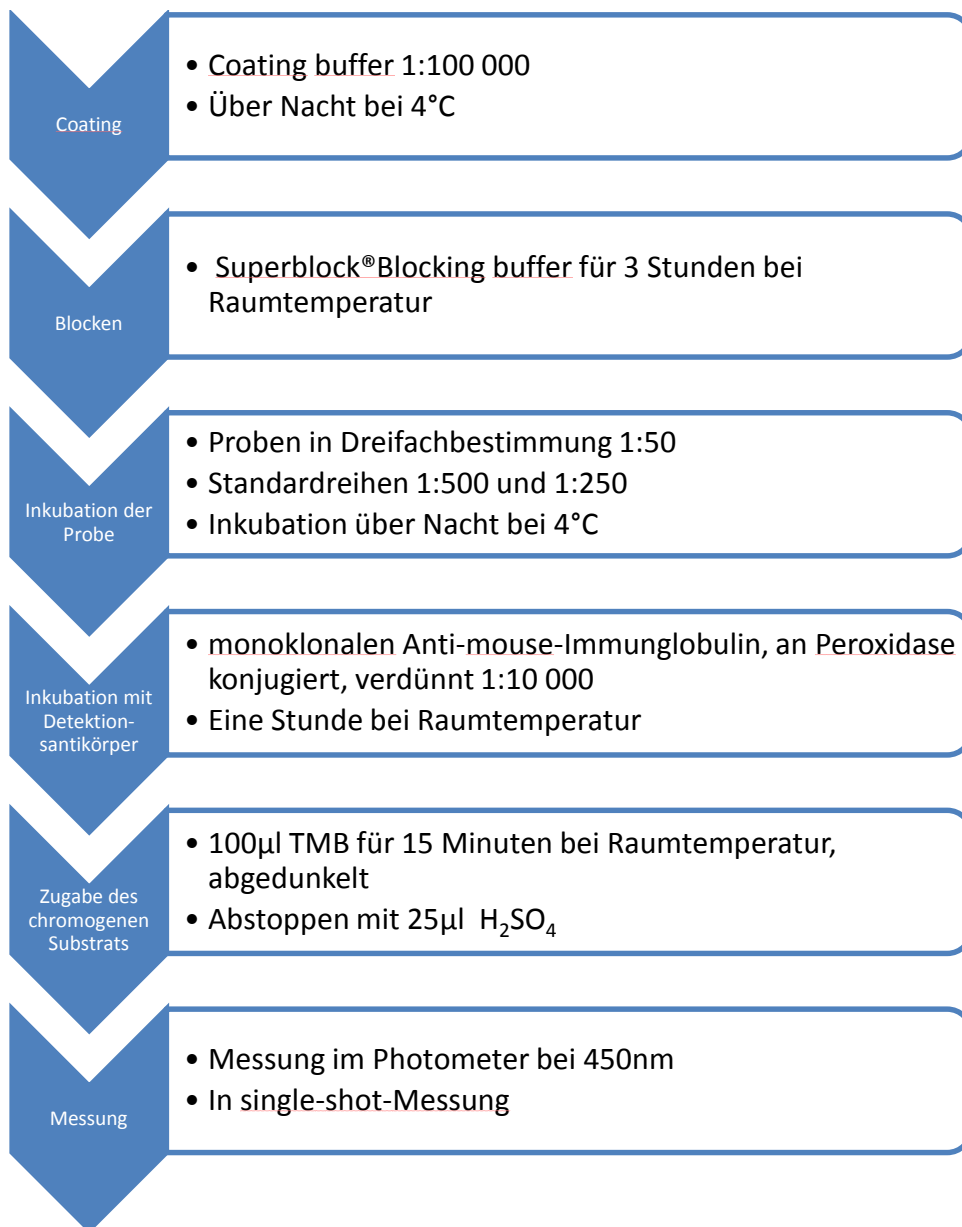


Abbildung 9: Schematische Darstellung der methodischen Arbeitsschritte des ELISA im zeitlichen Ablauf.

## 2.6 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SigmaStat Statistical Software 3.1 (Statcon, Witzenhausen, Germany) und Excel (Microsoft Corporation, Seattle/USA).

Für die beiden Verhaltensversuche wurden eine deskriptive Statistik sowie eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) bei multiplen Vergleichen und anschließender Bonferroni-Korrektur auf Signifikanz durchgeführt.

Bei der ANOVA wurde eine abhängige Variable (hier: Verhalten der Maus) mit mehreren unabhängigen Variablen (hier z.B. Therapiegruppe, Zeit etc.) untersucht. Die abhängige Variable sollte dabei intervallskaliert und normalverteilt sein. Die unabhängigen Variablen werden als Faktoren oder Einflussvariablen bezeichnet und sind für die Varianz der abhängigen Variable verantwortlich.

So wurden neben dem Einfluss der einzelnen unabhängigen Variablen auf die abhängige Variable, auch Wechselwirkungen der unabhängigen Variablen betrachtet, also ob es Interaktionseffekte gibt und inwieweit die unabhängigen Variablen Zeit (Woche 1-11) und Behandlung (IVIG vs. Kontrolle) das Verhalten beeinflussen.

Hierbei wurde zur Prüfung eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Versuchsgruppen getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen.

Im Anschluss wurde eine Bonferroni-Korrektur nach Carlo Emilio Bonferroni durchgeführt. Diese Methode neutralisiert die Fehler-Kumulierungen bei der Vielzahl der Paarvergleiche, die in dieser mehrfaktoriellen ANOVA durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse der Gewebeproben wurden mit deskriptiver Statistik analysiert. Vergleiche zwischen den beiden Gruppen erfolgten mittels des ungepaarten t-Tests, der die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass ein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen statistisch signifikant ist oder nur zufällig besteht. Der Stichprobenkennwert des t-Tests ist die Differenz der Mittelwerte.

Die Ergebnisse der Experimente sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als signifikant galten alle Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ .

In den Abbildungen wurden die Wahrscheinlichkeiten  $p \leq 0,05$  mit einem Sternchen (\*),  $p \leq 0,01$  wurde mit zwei Sternchen (\*\*) und  $p \leq 0,001$  mit drei Sternchen (\*\*\*) gekennzeichnet.

## 2.7 Verwendete Materialien

### 2.7.1 Chemikalien und Kits

Tabelle 3: Chemikalien und Kits

<b><i>Chemikalie/ Kit</i></b>	<b><i>Wirkstoff</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>
BCA Protein Assay Kit	(Mit Reagent A, Reagent B und Albumin Standard)	Pierce®, Thermo Scientific, Deutschland
Complete, EDTA-free; Protease Inhibitor Cocktail Tablets		Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
TMB soluble		Pierce® (Perbio), Thermo Scientific Pierce, Deutschland
T-PER	Tissue Protein Extraction Reagent	Pierce®, Thermo Scientific, Deutschland
Tween® 20	Ph.Eur. Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat, Polysorbat 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

## 2.7.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration, Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller, Bezug</b>
	0,8g NaCO <sub>3</sub>	
Coating Puffer	1,47g Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>  in 500ml MiliQ (pH=9,6)	Eigene Herstellung
Ethanol	Rotipuran ® >99,8%, p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PFA, Formaldehydlösung 3,5- 3,7%, Neutral gepuffert	Formaldehydlösung 35- 37%; Natriumhydrogenphosphat- dihydrat; di- Natriumhydrogen- phosphat- dihydrat; Demineral. Wasser	Otto Fischar GmbH and Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Schwefelsäure	2 molar	Eigene Herstellung
Superblock® Blocking Buffer		Pierce®, Thermo Scientific, Deutschland
Waschpuffer	PBS  0,05%Tween20	Eigene Herstellung

Wasser:

Wenn nicht anders beschrieben wurde Milli-Q Wasser verwendet. Das Wasser wurde entionisiert (VE-Wasser) und anschließend durch ein *Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification* System gereinigt.

### 2.7.3 Medikamente und Arzneimittel

Tabelle 5: Medikamente und Arzneimittel

<b><i>Chemikalie</i></b>	<b><i>Konzentration</i></b>	<b><i>Bezug</i></b>
<i>IVIG</i>	Octagam 50mg/ml	Octagam, Octapharma, Österreich
<i>Dulbeco's PBS (1x), mit Ca und Mg</i>		PAA, Pasching, Austria
<i>Kochsalzlösung</i>	NaCl 0,9%, Glasflasche	B. Braun, Melsungen AG, Deutschland
<i>Ketamin 0,1mg</i>	Kemint 10%	Alvetra GmbH, Neumünster, Deutschland
<i>Xylazin</i>	Rompun 2%	Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland

## 2.7.4 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

<b><i>Antikörper</i></b>	<b><i>Konzentration</i></b>	<b><i>Hersteller, Bezug</i></b>
<i>MAHA Standard</i>	Purified Mouse Anti-human Ig, kappa light chain 0,5 mg/ml	BD Biosciences Pharmingen, New York, USA
<i>Anti human IgG<sub>1</sub> HandL (Goat) POD</i>	1 mg/ml	Calbiochem © Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## 2.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Geräte und Verbrauchsmaterialien

<b><i>Gerät</i></b>	<b><i>Typbezeichnung, Produktname</i></b>	<b><i>Hersteller, Bezug</i></b>
<i>Automatische Pipette</i>	Research pro®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Bench</i>	Hera Safe	Thermo, Scientific, Deutschland
<i>Bildschirm</i>	Philips, 17“	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland



<i>CCD-Kamera mit Objektiv</i>	ENE0 1316S	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
<i>Computer</i>	Pharmacomp Pentium 4	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
<i>ELISA Platten</i>	Microton, 96K, U-Form. Bindungskapazität: hoch  (LOT: 10401161)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
<i>ELISA Reader</i>	Infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
<i>ELISA washer</i>	Biotrak II	Amersham Biosciences, USA/Germany
<i>Feinwaage</i>	Sartorius (Produktnummer YACO1ME1)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
<i>Glasflaschen</i>		Schott AG, Mainz, Deutschland
<i>Große Zentrifuge (xg)</i>	Biofuge Stratos  (Fabrikatnummer: 40233076)	Kendro, Osterode, Deutschland
<i>HDD-/DVD-Recorder</i>	Modell RH277H	LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen, Deutschland; TSE Systems GmbH,

		Bad Homburg, Deutschland
<i>Injektionsnadeln</i>	Sterican (45x12) 26G	B. Braun, Melsungen AG, Deutschland
<i>Latex-Handschuhe</i>	NOBAGLOVE®	NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter, Deutschland
<i>Low-bind Reagiergefäße 1,5 ml, 0,5 ml</i>		Sarstedt AG and Co., Nümbrecht, Deutschland
<i>Low-bind Reagiergefäße 2ml</i>		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Multipette</i>	Eppendorf Research® (Mehrkanalpipette)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Parafilm</i>		Bemis, Neenah, USA
<i>Pipetten</i>	Eppendorf Research® (Einkanalpipette)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Pipettenspitzen (1000µL, 200 µL, 10 µl)</i>		Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
<i>Pipetto</i>	Accu-jet® pro	Brand GmbH+ Co. KG Wertheim, Deutschland
<i>Pistill</i>	Eppipistill aus Edelstahl für Reaktionsgefäße	Schmitt Labortechnik, Wien, Österreich
<i>Plastikröhre, Falcon (15 ml, 50 ml)</i>		Sarstedt AG and Co., Nümbrecht, Deutschland

*Reagiergefäße (2ml/  
1,5ml/ 0,5 ml)*

Sarstedt AG and Co.,  
Nümbrecht, Deutschland

*Selbstklebendes  
Abdecktuch*

Folidrape 50x50

Paul Hartmann AG,  
Heidenheim,  
Deutschland

*Serologische Pipetten  
(25/10/5 ml)*

Sarstedt AG and Co.,  
Nümbrecht, Deutschland

*Spektrophotometer*

NanoDrop ND-1000

Peqlab Biotechnologie  
GmbH, Erlangen,  
Deutschland

*Tuberkulinspritzen 1,0ml*

NORM-JECT®  
Insulinspritze, 1ml,  
U100

B. Braun, Melsungen  
AG, Deutschland

*Vernichtungsbeutel*

Sarstedt AG and Co.,  
Nümbrecht, Deutschland

*Vortexer*

Relax top

Heidolph Instruments,  
Schwabach,  
Deutschland

*Waage*

Ohaus® Scout  
Prod.-Nr.: SC4010

Ohaus, Parsippany, USA

*Zentrifuge*

Galaxy 16 DH  
Seriennummer:  
R712367

VWR, Darmstadt,  
Deutschland

### III Ergebnisse

---

Der Ergebnisteil ist untergliedert in die Ergebnisse der Verhaltensversuche und die Ergebnisse aus den entnommenen Gewebeproben.

110 Mäuse wurden in die Studie aufgenommen, ein Tier verstarb vorzeitig, so dass nunmehr insgesamt 109 Mäuse im Beobachtungszeitraum auf Änderungen im Verhalten und auf ihren Immunstatus untersucht wurden. Sie haben alle die Openfield- und Y-Maze-Apparatur durchlaufen, bevor ihnen die Gewebeproben entnommen wurden.

Die Daten der beiden untersuchten Gruppen, IVIG- und Kontrollgruppe, wurden als normalverteilt angenommen.

#### 3.1 Auswertung der Verhaltensversuche

##### 3.1.1 Einfluss von IVIG auf Lokomotion und Exploration im Openfieldversuch

Um die Auswirkungen der Behandlung auf das grundlegende Verhalten zu beurteilen, wurden die motorische Funktion und das Erkundungsverhalten herangezogen. Gemessen und ausgewertet wurden hierfür sowohl die horizontale Aktivität mittels zurückgelegter Wegstrecke und Aufenthaltsdauer in den definierten Zonen, als auch das Aufrichtverhalten als vertikale Aktivität.

Die Auswertung der horizontalen Aktivität ergab keinen Einfluss der IVIG-Therapie auf das untersuchte Verhalten. Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte keine signifikanten Differenzen zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich der absolut zurückgelegten Wegstrecke.

Unabhängig von der Behandlungsart zeigten die Mäuse beider Gruppen einen deutlich signifikanten Unterschied in der zurückgelegten Wegstrecke über den Beobachtungszeitraum von elf Wochen ( $F(1,10)=9,24$ ,  $p<0,001$ ). Im anschließenden Post-hoc Tukey Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wochen 5 vs. 2 ( $p<0,001$ ), 3 ( $p<0,001$ ), 4 ( $p<0,001$ ), 6 ( $p<0,001$ ), 7 ( $p<0,001$ ), 8 ( $p<0,001$ ), 9 ( $p<0,001$ ), 10 ( $p<0,001$ ) und 11 ( $p<0,001$ ) und in Woche 5 vs. Woche 1 mit einer Signifikanz von  $p<0,05$ . Wie Abbildung 10 zu

erkennen ist, wurde in Woche 5 von beiden Gruppen eine ersichtlich kürzere Wegstrecke zurückgelegt. Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigte sich in den zurückgelegten Wegstrecken der Wochen 1 vs. 9 mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

Die Aufenthaltsdauer in der zentralen Region wurde nicht durch die IVIG-Behandlung beeinflusst. Weder Behandlungsart, Behandlungsdauer noch die Interaktion von Behandlungsart und -dauer zeigten einen Einfluss auf die horizontale Aktivität in der zentralen Region (s. Abbildung 11, S. 48).

Auch in der vertikalen Aktivität ließ sich kein Einfluss durch eine Behandlung mit IVIG nachweisen. Die Auswertung des Aufrichtverhaltens zeigte weder in der absoluten Zahl noch im prozentualen Anteil signifikante Unterschiede. Im Vergleich des Aufrichtverhaltens in der zentralen Region war jedoch ein Trend über die Behandlungsdauer detektierbar ( $F(1, 10) = 1,3$ ,  $p = 0,086$ ), s. auch Abbildung 12, S. 49 und Abbildung 13, S. 50.

## Horizontale Aktivität im Openfield (a)

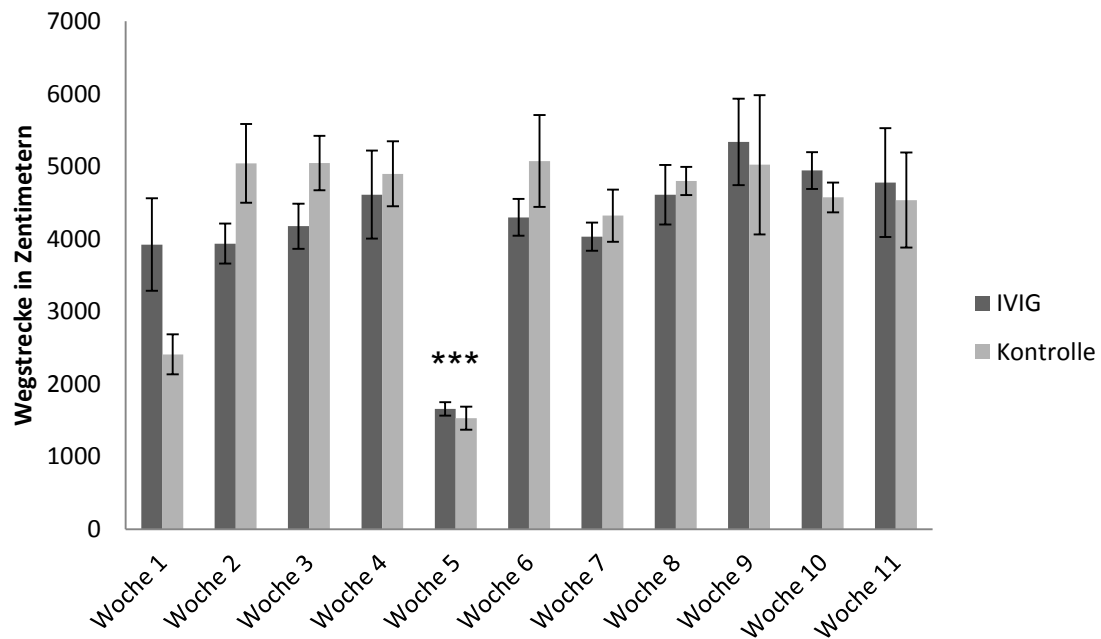


Abbildung 10: Explorationsverhalten weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse, beurteilt anhand der zurückgelegten Wegstrecke im Openfieldversuch über eine Versuchsdauer von 20 Minuten.

Der Openfieldversuch wurde sechs Tage nach der letzten Injektion von IVIG und PBS (Kontrolle) durchgeführt bei einer Versuchsdauer über 11 Wochen.

Die zurückgelegte Wegstrecke (in Zentimetern) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Deutlich zu erkennen war innerhalb beider Behandlungsgruppen ein signifikanter Einbruch der Wegstrecke in Woche 5 vs. 2 ( $p < 0,001$ ), 3 ( $p < 0,001$ ), 4 ( $p < 0,001$ ), 6 ( $p < 0,001$ ), 7 ( $p < 0,001$ ), 9 ( $p < 0,001$ ), 10 ( $p < 0,001$ ) und 11 ( $p < 0,001$ ) (\*\*\*).

Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  ist mit (\*),  $p \leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p \leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet.

## Horizontale Aktivität im Openfield (b)

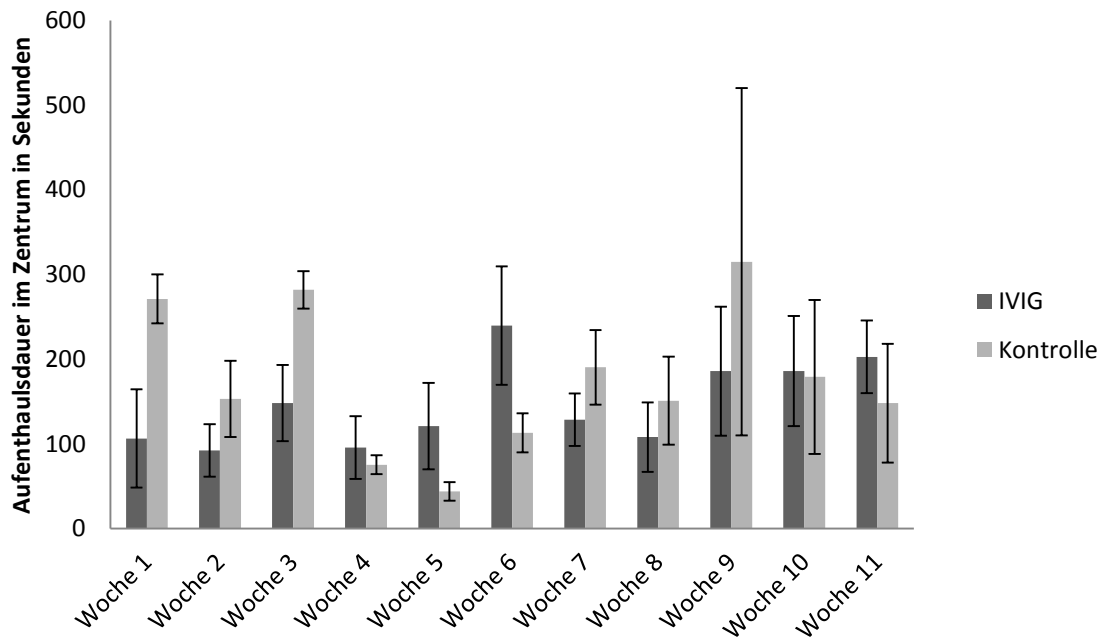


Abbildung 11: Explorationsverhalten weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse, beurteilt anhand der zurückgelegten Wegstrecke im Openfieldversuch über eine Versuchsdauer von 20 Minuten.

Der Openfieldversuch wurde sechs Tage nach der letzten Injektion von IVIG und PBS (Kontrolle) durchgeführt bei einer Versuchsdauer über 11 Wochen.

Aufgetragen wurde die Zeit, die sich die Versuchstiere in der zentralen Region der Openfield-Apparatur aufgehalten haben (in Sekunden). Bezüglich der Aufenthaltsdauer in der zentralen Region konnte kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen oder über die Versuchszeit detektiert werden.

Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  ist mit (\*),  $p \leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p \leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet.

## Vertikale Aktivität im Openfield (a)

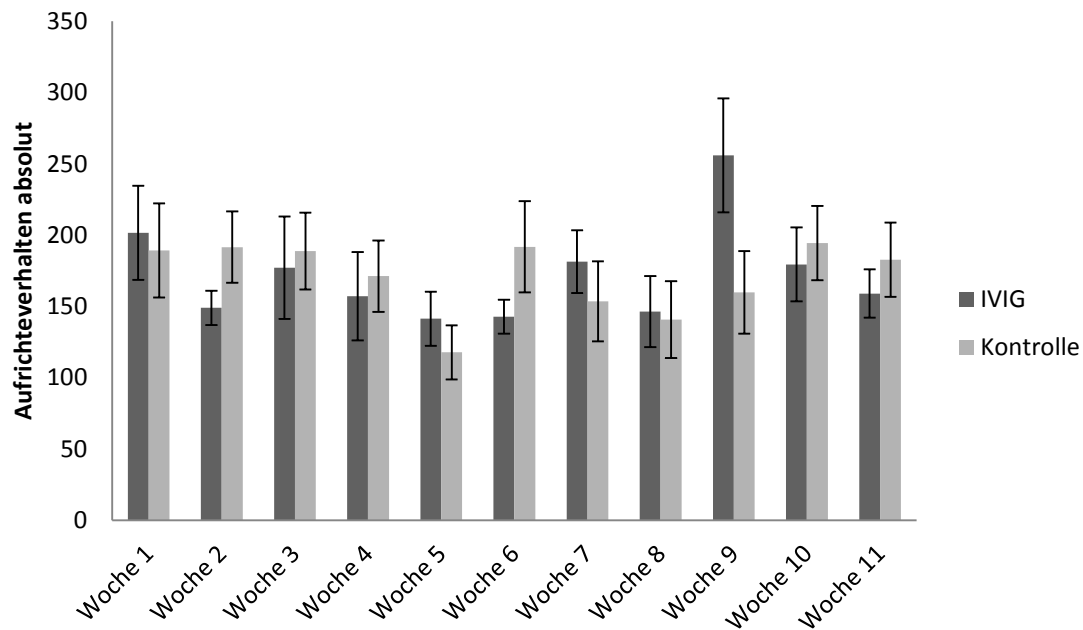


Abbildung 12: Explorationsverhalten weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse beurteilt anhand des absoluten Aufrichteverhaltens im Openfieldversuch über eine Versuchsdauer von 20 Minuten.

Der Openfieldversuch wurde sechs Tage nach der letzten Injektion von IVIG und PBS (Kontrolle) durchgeführt bei einer Versuchsdauer über 11 Wochen.

Es konnte kein Einfluss der IVIG-Behandlung auf die vertikale Aktivität nachgewiesen werden. Das Aufrichtverhalten der Tiere hat sich zwischen den Gruppen in der absoluten Anzahl nicht signifikant unterschieden. Es ließ sich ein Trend im Aufrichtverhalten über den Beobachtungszeitraum von 11 Wochen erkennen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen über die Versuchsdauer detektiert werden.

Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  ist mit (\*),  $p \leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p \leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet.



## Vertikale Aktivität im Openfield (b)

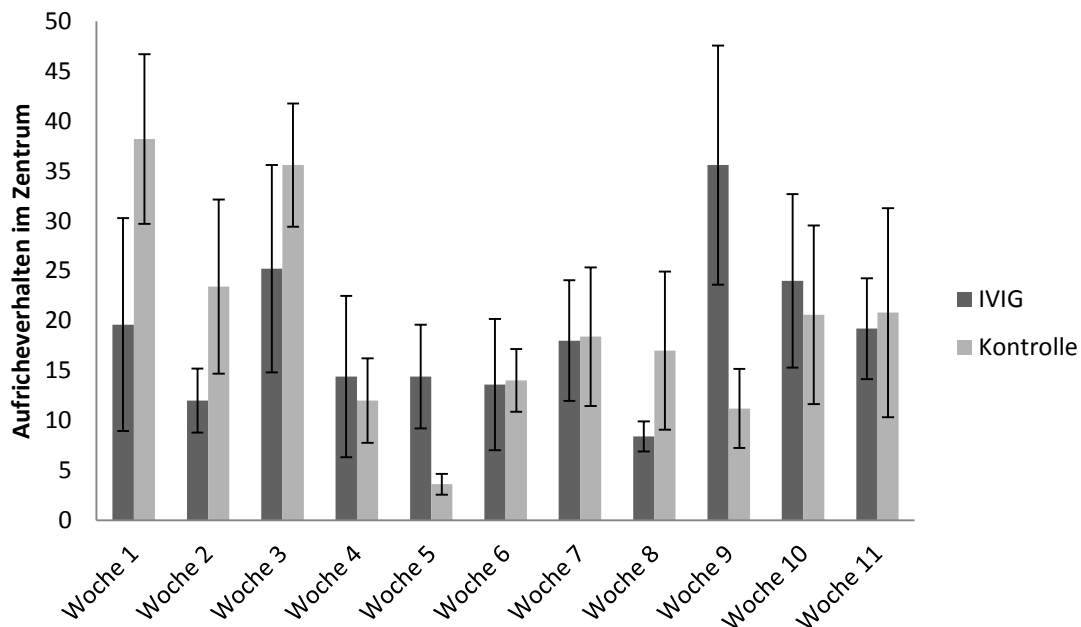


Abbildung 13: Explorationsverhalten weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse beurteilt anhand des Aufrichteverhaltens im Zentrum im Openfieldversuch über eine Versuchsdauer von 20 Minuten.

Der Openfieldversuch wurde sechs Tage nach der letzten Injektion von IVIG und PBS (Kontrolle) durchgeführt bei einer Versuchsdauer über 11 Wochen.

Es konnte kein Einfluss der IVIG-Behandlung auf die vertikale Aktivität nachgewiesen werden. Das Aufrichtverhalten der Tiere hat sich zwischen den Gruppen in der Anzahl im Bereich des Zentrums nicht signifikant unterschieden. Bei den IVIG-behandelten Tieren zeigt sich eine nicht signifikante Zunahme des prozentualen Aufrichtens in der zentralen Region. Es konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen über die Versuchsdauer detektiert werden.

Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  ist mit (\*),  $p \leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p \leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet.

### 3.1.2 Einfluss von IVIG auf Alternation und räumliches Gedächtnis im Y-Mazeversuch

Im Y-Maze wurde das räumliche Denken und Arbeitsgedächtnis anhand der Alternierungen bei den abgelaufenen Armeintritten, der Verweildauer in den Armen des Y-Maze sowie den absolut zurückgelegten Wegstrecken untersucht.

Es ließ sich kein signifikanter Nachweis für einen Einfluss der IVIG-Behandlung auf die gelaufene Strecke, die verbrachte Zeit in den Y-Maze-Armen, die Anzahl der Armeintritte und das spontane Alternierungsverhalten nachweisen. Lediglich in Behandlungswochen 2 ( $p<0,05$ ) und 10 ( $p<0,05$ ) konnte ein signifikanter Unterschied in der Alternierungsrate zwischen den beiden Behandlungsgruppen gefunden werden ( $F(1,10)=2,08$ ,  $p<0,05$ ). In Behandlungswoche 2 zeigen die Tiere der Kontrollgruppe eine Alternierungsrate von 50,0% im Vergleich zu den Tieren der IVIG-Gruppe, welche lediglich mit einer Alternierungsrate von 31,1% die Arme betreten. In Behandlungswoche 10 hingegen, haben die IVIG-behandelten Mäuse mit 45,2% eine deutlich höhere Alternierungsrate als die Mäuse der Kontrollgruppe mit 28,6% (s. Abbildung 14, S. 52).

Über den Versuchszeitraum konnte unabhängig von der Behandlungsgruppe ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Gesamteintritte in die Y-Maze-Arme detektiert werden ( $F(1, 10)=2,15$ ,  $p<0,05$ ). Hier fanden sich die Signifikanzen zwischen Woche 5 vs. 2 ( $p<0,05$ ) und 9 ( $p<0,05$ ) (s. Abbildung 15, S. 53).

Ein weiterer signifikanter Unterschied über den Versuchszeitraum bestand in der gelaufenen Wegstrecke ( $F(1, 10)=2,03$ ,  $p<0,05$ ), welcher sich zwischen Woche 5 und 9 zeigte. In Woche 5 wurde die minimal gelaufene Wegstrecke innerhalb der gesamt beobachteten Versuchsdauer gemessen mit 1912,3cm in der Versuchsgruppe bzw. 1838,0cm in der Kontrollgruppe (s. auch Abbildung 16, S. 54). Ein zunehmender Trend konnte bei der verbrachten Zeit in den Armen beschrieben werden ( $F(1, 10)=1,898$ ,  $p=0,056$ ).

### Arbeitsgedächtnis im Y-Maze (a)

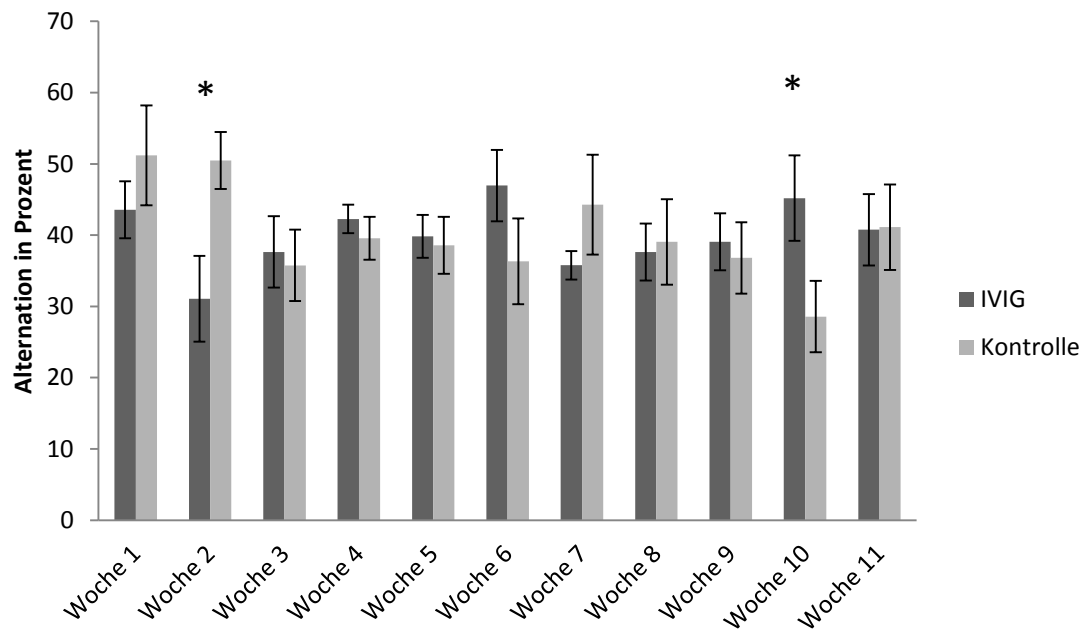


Abbildung 14: Arbeitsgedächtnis weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse im Y-Mazeversuch anhand der Alternation über eine Versuchsdauer von 10 Minuten.

Der Y-Mazeversuch wurde sechs Tage nach der letzten Injektion von IVIG und PBS (Kontrolle) durchgeführt bei einer Versuchsdauer über 11 Wochen.

Diese Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der Alternationen, also der Anzahl der tatsächlichen Wechselfolgen aller drei Arme nacheinander im Verhältnis zu den theoretisch möglichen Wechselfolgen aller drei Arme nacheinander.

Es konnte kein Einfluss der IVIG-Behandlung auf die gelaufenen Alternationen prozentual zu der möglichen Anzahl an Alternationen detektiert werden. Auch über den Beobachtungszeitraum von 11 Wochen konnten keine signifikanten Unterschiede

nachgewiesen werden. In Woche 2 und 10 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen nachgewiesen werden ( $F(1,10)=2,08$ ,  $p<0,05$ ).

Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p\leq 0,05$  ist mit (\*),  $p\leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p\leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet.

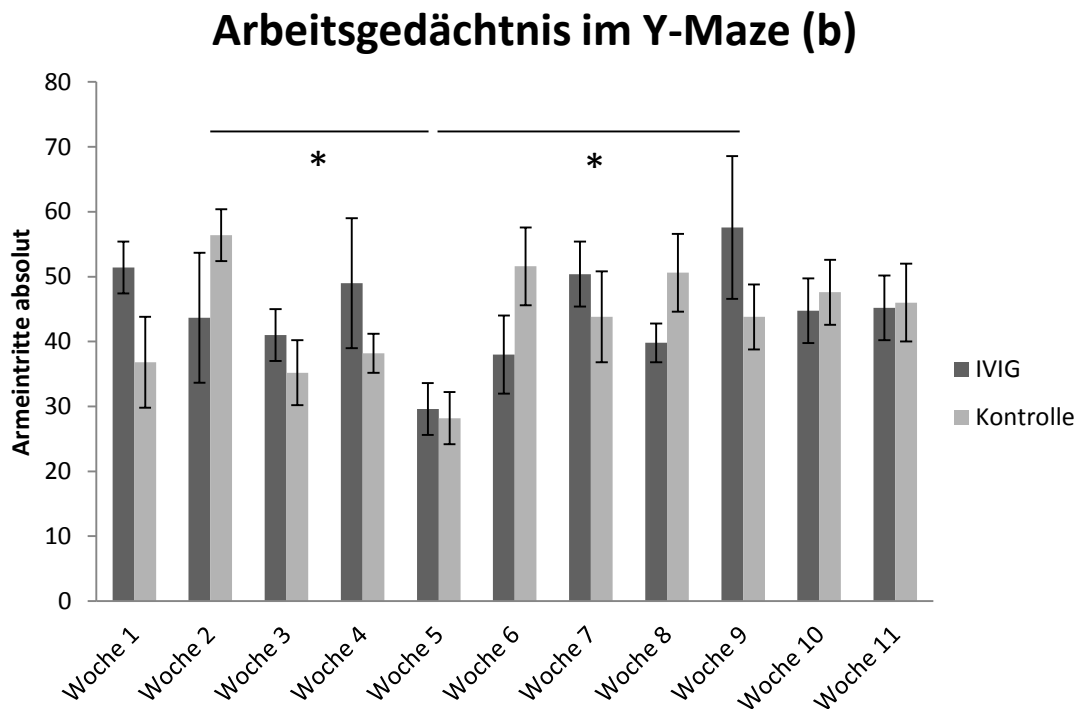


Abbildung 15: Arbeitsgedächtnis weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse im Y-Mazeversuch anhand der absoluten Anzahl der Eintritte in die Arme der Y-Mazeversuchsanlage über eine Versuchsdauer von 10 Minuten.

Der Y-Mazeversuch wurde sechs Tage nach der letzten Injektion von IVIG und PBS (Kontrolle) durchgeführt bei einer Versuchsdauer über 11 Wochen.

Die Anzahl der Armeintritte unterschied sich in den Behandlungsgruppen nicht signifikant. Unabhängig der Behandlungsgruppe konnte ein signifikanter Unterschied

( $F(10)=2,15$ ,  $p<0,05$ ) in den Armeintritten über die Wochen 2 vs. 5 ( $p<0,05$ ) und 5 vs. 9 ( $p<0,05$ ) beschrieben werden.

Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p\leq 0,05$  ist mit (\*),  $p\leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p\leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet.

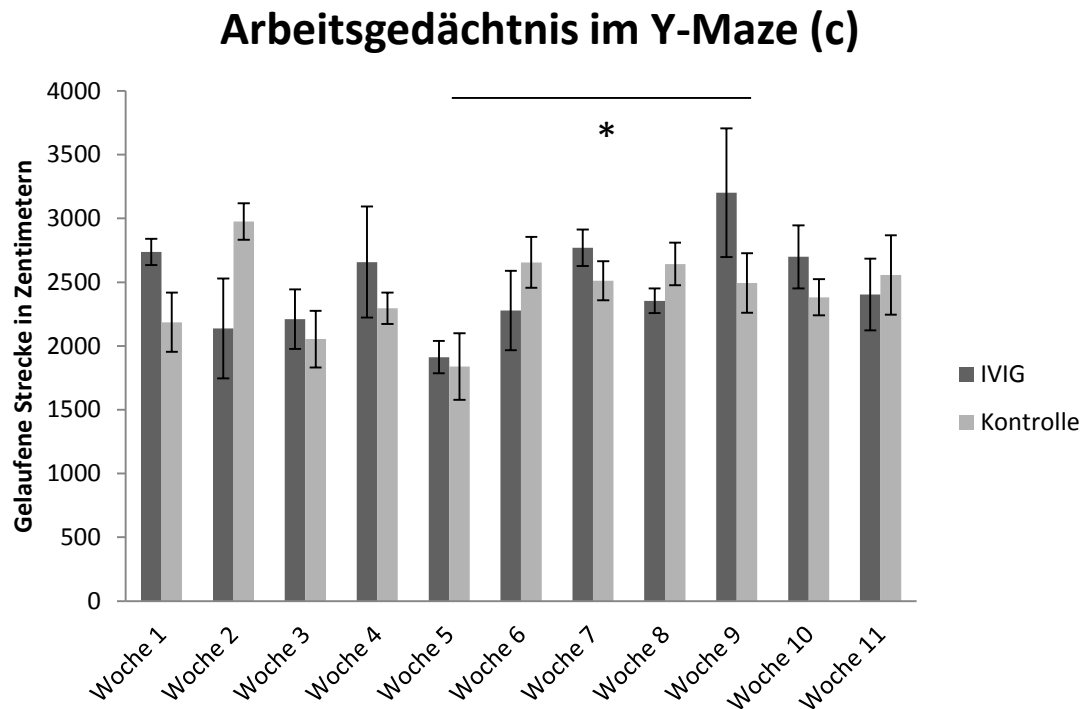


Abbildung 16: Arbeitsgedächtnis weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse im Y-Mazeversuch anhand der zurückgelegten Wegstrecke über eine Versuchsdauer von 10 Minuten.

Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich der gelaufenen Wegstrecke. Die Wochen 5 vs.9 unterschieden sich in beiden Behandlungsgruppen unabhängig der Behandlungsart signifikant ( $F(1,10)=2,03$ ,  $p<0,05$ )).

Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p\leq 0,05$  ist mit (\*),  $p\leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p\leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet.

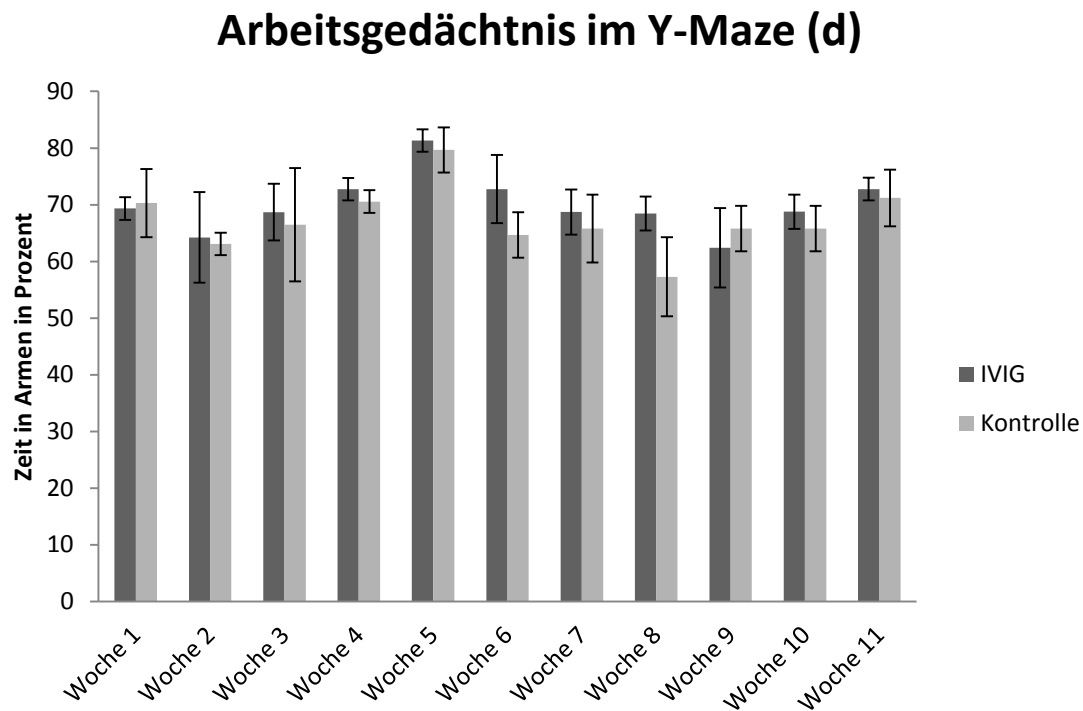


Abbildung 17: Arbeitsgedächtnis weiblicher adulter C57/B6J-Mäuse im Y-Mazeversuch anhand der Zeit, die in den Armen der Y-Mazeapparatur verbracht wurde prozentual zur Versuchsdauer von 10 Minuten.

Gezeigt wird der Anteil der Versuchsdauer, den die Mäuse in den Armen der Y-Maze-Apparatur verbracht haben gegenüber dem Anteil, der in der nicht als Versuchszone definierten Mitte der Versuchsapparatur. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen detektiert werden. Bezüglich der Verweildauer kann ein Trend über die Behandlungswochen beschrieben werden ( $F(1, 10)=1,898$ ,  $p=0,056$ ).

Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  ist mit (\*),  $p \leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p \leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet.

### 3.2 Auswertung von Körper- und Milzgewicht

Die Untersuchung und statistische Auswertung der Körper- und Milzgewichte zeigte keinen Einfluss der IVIG-Therapie. Wie erwartet, konnte jedoch eine Gewichtszunahme innerhalb der Behandlungsgruppen über die zwölf Wochen Versuchsdauer ermittelt werden.

Bezüglich der Behandlungsdauer zeigten sich somit signifikante Unterschiede im Körpergewicht ( $F(1,10)=4,4$ ,  $p<0,001$ ) und Milzgewicht ( $F(1, 10)=3,1$ ,  $p<0,05$ ) unabhängig von der Behandlungsart. Der Tukey-Test ergab signifikante Unterschiede im Körpergewicht in Woche 1 vs. 10 ( $p<0,001$ ), Woche 2 vs. Woche 10 ( $p<0,01$ ), Woche 3 vs. 10 ( $p<0,01$ ), Woche 4 vs. 10 ( $p<0,05$ ) und Woche 7 vs.10 ( $p<0,05$ ). Ebenso findet sich eine Signifikanz in Woche 1 vs. Woche 8 ( $p<0,01$ ) und Woche 1 vs. 9 ( $p<0,05$ ) (s. auch Abbildung 18, S.57).

Im Milzgewicht zeigten sich unabhängig der Behandlungsart signifikante Unterschiede im Tukey-Test zwischen Woche 1 vs. Woche 8 ( $p<0,01$ ) und Woche 1 vs. Woche 9 ( $p<0,01$ ) sowie Woche 1 vs. 7 ( $p<0,05$ ), Woche 1 vs. 6 ( $p<0,05$ ) und Woche 1 vs. 11 ( $p<0,05$ ) (s. auch Abbildung 19, S.58).

Bei einem durchschnittlichem Körpergewicht der IVIG-behandelten Tiere von 22,2g in Woche 1 war ein Anstieg auf 25,2g in Woche 11 zu verzeichnen, das Milzgewicht stieg von 81,2mg auf 126,7mg an. In der Kontrollgruppe wurde ein Gewichtsanstieg von 22,2g im Mittel auf 25,7g gemessen, das Milzgewicht nahm von 74mg auf 107,7mg zu. Der prozentuale Anteil des Milzgewichtes am Körpergewicht zeigte keine Entwicklung (Daten nicht gezeigt).

## Körpergewicht von C57/B6J über 11 Wochen

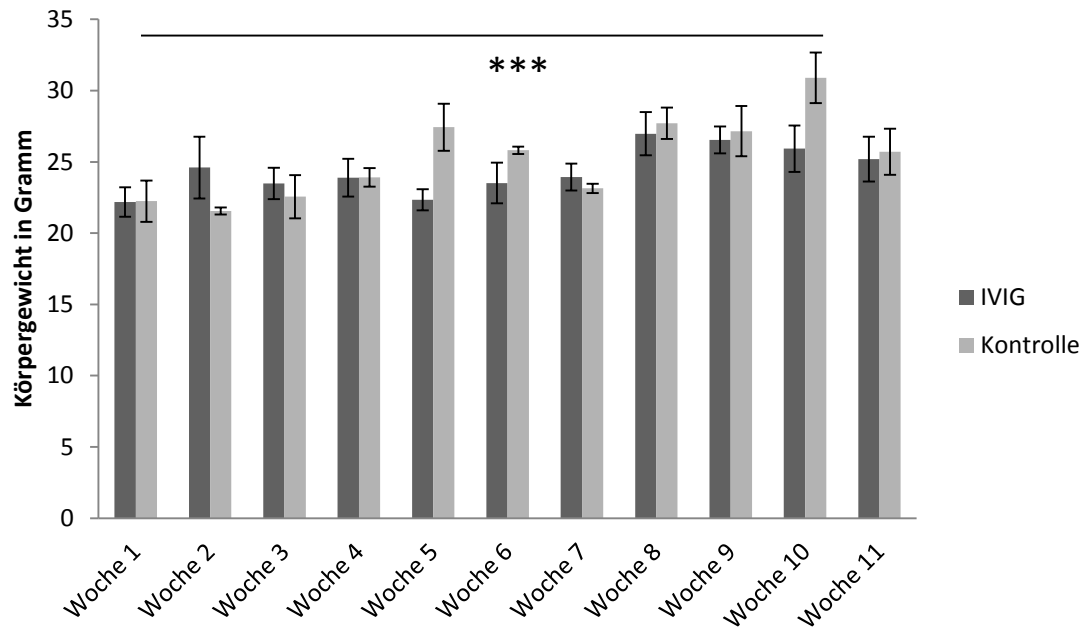


Abbildung 18: Verlauf des Körpergewichts von weiblichen adulten C57/B6J-Mäusen unter IVIG-Behandlung über eine Beobachtungsdauer von elf Wochen.

Das Körpergewicht zeigt über die Behandlungsdauer einen signifikanten Anstieg unabhängig von der Behandlungsart (\*). Der an die ANOVA anschließende Tukey-Test ergab Signifikanzen zwischen Woche 1 vs. 10 ( $p < 0,001$ ), Woche 10 vs. Woche 2 ( $p < 0,01$ ), 3 ( $p < 0,01$ ), 4 ( $p < 0,01$ ) und 7 ( $p < 0,05$ ), Woche 1 vs. Woche 8 ( $p < 0,01$ ) und 9



( $p < 0,05$ ) unabhängig von der Behandlungsart. Zugunsten der Übersicht ist lediglich eine Signifikanz gezeigt.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  ist mit (\*),  $p \leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p \leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet. Alle Ergebnisse wurden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

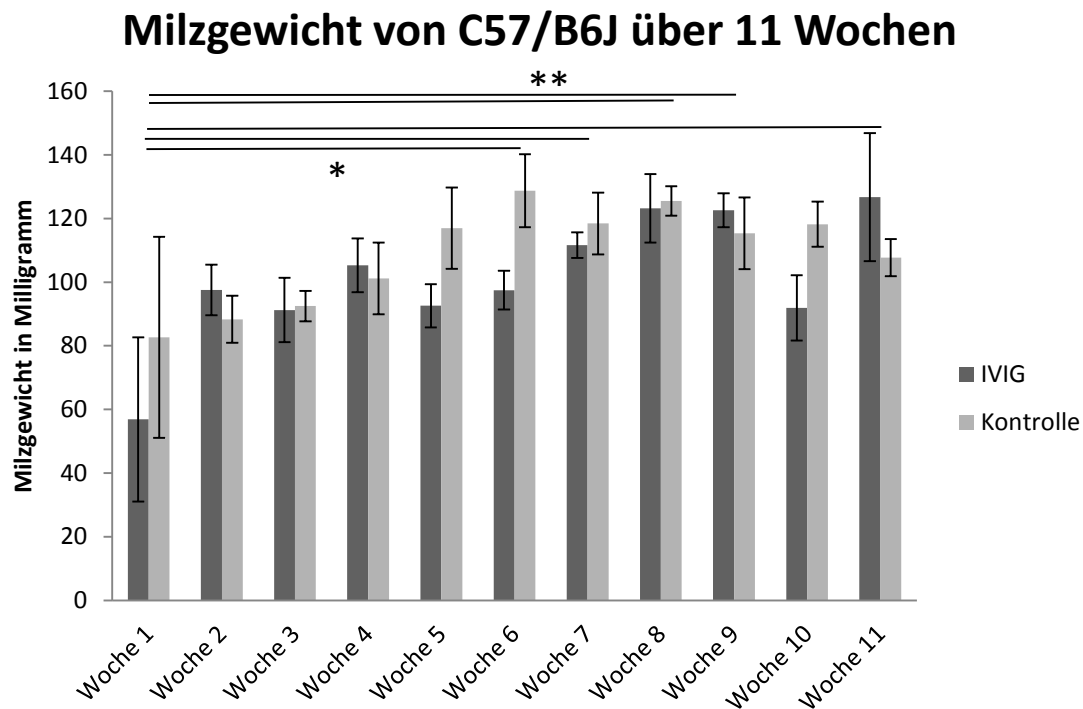


Abbildung 19: Verlauf des Milzgewichtes von weiblichen adulten C57/B6J-Mäusen unter IVIG-Behandlung über eine Beobachtungsdauer von elf Wochen.

Hier ist ein signifikanter Anstieg des Gewichts unabhängig von der Behandlung zu detektieren. Der an die ANOVA anschließende Tukey-Test ergab signifikante Unterschiede zwischen Woche 1 vs. Woche 8 und 9 ( $p < 0,01$ ) sowie Woche 1 vs. 6 ( $p < 0,05$ ) und Woche 1 vs. 7 ( $p < 0,05$ ) und Woche 1 vs. 11 ( $p < 0,05$ ).

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  ist mit (\*),  $p \leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p \leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet. Alle Ergebnisse wurden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

### 3.3 Auswertung der MAHA-Antwort

Um eine MAHA-Antwort auf das injizierte humane IgG zu erforschen, wurde den Versuchsmäusen Serum und Gehirn entnommen, aufbereitet und mittels ELISA auf MAHA untersucht.

### 3.3.1 MAHA-Antwort im Serum

Die zweifaktorielle ANOVA der ELISA der Serumwerte bezüglich der Antikörperkonzentration ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, über die gesamte Versuchsdauer konnten auch keine Unterschiede in der Interaktion Behandlungsart und Versuchswoche festgestellt werden.

Messbar ist ein leichter Anstieg der Antikörperkonzentration ab der zweiten Injektion in der Versuchswoche 2, welche beständig bis Woche 8 auf diesem Niveau bleibt. Ab Woche 9, somit nach neun Injektionen, war ein steiler Anstieg der MAHA-Antwort im Serum zu verzeichnen und ein zunehmender Trend zu beschreiben (s. Abbildung 20, S.60). In Woche 1 bis 9 konnte innerhalb beider Gruppen sowie beim Vergleich beider Gruppen kein signifikanter Unterschied detektiert werden. In der IVIG-behandelten Gruppe konnte ab Woche 10 ein signifikanter Anstieg gegenüber Woche 1 nachgewiesen werden (Woche 1 vs. Woche 10,  $t(7) = 2.94$ ,  $p < 0.05$ ; Woche 1 vs. Woche 11,  $t(7) = 2,92$ ,  $p < 0.05$ ).

In der Kontrollgruppe konnte mittels t-Test ebenfalls eine signifikante Differenz zwischen Behandlungswoche 1 vs. 11 nachgewiesen werden ( $t(7)=2,62$ ,  $p<0,05$ ).

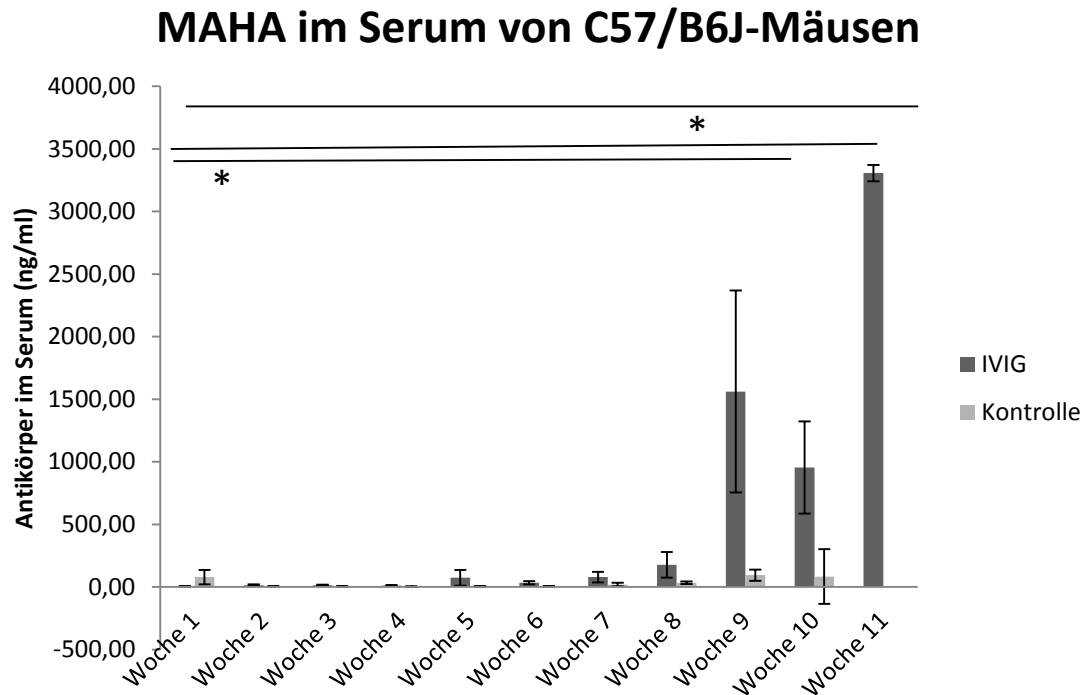


Abbildung 20: MAHA-Konzentration im Serum von weiblichen adulten C57/B6J-Mäusen unter IVIG-Behandlung über eine Beobachtungsdauer von elf Wochen.

Es ist in der IVIG behandelten Versuchsgruppe ab Woche 2 ein Anstieg der MAHA zu messen, welcher bis Woche 9 konstant bleibt. Ab Woche 9 ist eine deutliche Zunahme der MAHA erkennbar (Woche 1 vs. Woche 10,  $t(7) = 2.94$ ,  $p < 0.05$ ; Woche 1 vs. Woche 11,  $t(7) = 2.92$ ,  $p < 0.05$ ). In der Kontrollgruppe wurde eine signifikante Differenz zwischen Behandlungswoche 1 vs. 11 nachgewiesen ( $t(7)=2,62$ ,  $p<0,05$ ).

Alle Ergebnisse wurden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  ist mit (\*),  $p \leq 0,01$  ist mit (\*\*) und  $p \leq 0,001$  mit (\*\*\*) gekennzeichnet.

Es war ein Trend bezüglich der MAHA-Konzentration zwischen den Behandlungsgruppen nachweisbar ( $F(1, 10)=3,55$ ,  $p=0,06$ ). Die Serumkonzentration der MAHA war in der Gruppe der IVIG-behandelten Tiere höher als in der PBS-behandelten Kontrollgruppe.

### 3.3.2 MAHA-Antwort im Gehirn

In den Proben der entnommenen Mäusehirne konnte über die zwölfwöchige Versuchsdauer kein Anstieg einer MAHA-Antwort nachgewiesen werden. Auf-

grund der Verteilung der detektierbaren Werte wurde keine weitere Statistik angefertigt.

Tabelle 8: MAHA-Reaktion im Gehirn weiblicher Wildtyp C57/B6J-Mäuse nach wöchentlicher Injektion von 400µg IVIG i.p..

Gezeigt wird die Antikörperkonzentration in mg/ml.

MAHA-Reaktion in mg/ml		
	IVIG	Kontrolle
Woche 1	n.d.	n.d.
Woche 2	n.d.	n.d.
Woche 3	n.d.	n.d.
Woche 4	n.d.	n.d.
Woche 5	n.d.	n.d.
Woche 6	0,89	0,84
Woche 7	0,88	21,48
Woche 8	0,97	n.d.
Woche 9	n.d.	n.d.
Woche 10	n.d.	n.d.
Woche 11	0,66	0,63

## IV Diskussion

---

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der MAHA-Reaktion bzw. den Auswirkungen einer IVIG-Therapie in C57/B6J-Mäusen. Hintergrund hierfür ist der häufige Einsatz von IVIG in der Therapieforschung von neuropsychiatrischen und neurodegenerativen Erkrankungen. In diesen Bereichen werden in Studien gehäuft Verhaltensversuche eingesetzt und deren Ergebnisse als primärer Endpunkt festgelegt (Hughes et al., 2009). Auch bei diversen anderen Erkrankungen steht IVIG im Zentrum der Therapieforschung: Die idiopathische thrombozytopenische Purpura ist ein Einsatzgebiet aus dem Kreise der autoimmunologischen Erkrankungen in dem IVIG-Präparate erfolgreich eingesetzt werden (Huang et al., 2010, Imbach, 2012), ebenso wie bei der antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörper positiven Vaskulitis (Svetlicky et al., 2012), dem Guillain-Barré-Syndrom (Kuwabara et al., 2001), der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (Cocito et al., 2002), der multiplen Sklerose (Lisak, 1998, Sorensen et al., 2002) oder der Myasthenia gravis (Barth et al., 2011). Aus dem Querschnittsbereich der Dermatologie wurde IVIG bei zahlreichen Erkrankungen ein positiver Therapieeffekt zugesprochen, z.B. in der Dermatomyositis (Dalakas et al., 1993), dem Lupus erythematoses (Shoenfeld and Katz, 2005) oder dem Pemphigus vulgaris (Amagai et al., 2009). Auch bei Karzinomkrankungen, wie zum Beispiel bei Sarkom-, Melanom-, Mamma- oder Kolonkarzinom-erkrankungen sowie der Metastasentherapie (Schwartz-Albiez et al., 2009) konnte IVIG bis dato erfolgreich eingesetzt werden.

### 4.1 Ziel der Studie

Der Planung dieser Versuchsreihe gingen Erkenntnisse größtenteils aus unserer Arbeitsgruppe voraus, die sich zu folgenden drei Punkten zusammenfassen lassen:

1. bei AD-Erkrankten ist der Spiegel von nAbs-A $\beta$  im Liquor erniedrigt (Du et al., 2001),
2. der Spiegel von nAbs-A $\beta$  im Serum ist hingegen erhöht (Weksler et al., 2002);

### 3. IVIG enthält autoimmune polyklonale Antikörper u.a. gegen nAbs-A $\beta$ (Dodel et al., 2002)

Daher rückte IVIG als Therapeutikum in den Fokus unserer Untersuchungen. So konnte in *in vivo*-Versuchen mit genmutierten Mäusen ein positiver Effekt durch eine IVIG-Therapie bei einem AD-Modell nachgewiesen werden (Magga et al., 2010). Desweiteren gibt es bereits Pilotstudien am Patienten der Arbeitsgruppen um Dodel und Relkin, bei denen IVIG in der AD eingesetzt wurde. Es konnte jedoch in beiden Studien kongruent ein Absinken der A $\beta$ -Titer im Liquor beobachtet werden (Dodel et al., 2004, Relkin, 2008, Relkin et al., 2009). Diese Studien konnten jedoch bei kleiner Stichprobe noch keinen sicheren Nachweis einer Verbesserung der Kognition erbringen.

Da das Hauptaugenmerk der Therapieforschung, wie bereits in Kapitel 1.3 und 1.6 beschrieben, in *in vivo*-Versuchen auf die Maus gerichtet ist, stellte sich uns die Frage nach der murinen Immunreaktion auf IVIG-Injektionen, da humane Immunglobuline für das murine Immunsystem, als körperfremdes Protein, ein Antigen darstellen. So formulierten wir die Hypothese, dass eine IVIG-Behandlung der Maus, unabhängig von der zu untersuchenden Grunderkrankung, zur Auslösung einer humoralen Immunreaktion mit Bildung spezifischer IgG durch Plasmazellen führt. Ergebnisse von Löffler et al. und Imboden et al. stützten diese Vermutung (Imboden et al., 2001, Loeffler et al., 2012).

Diese vorliegende Studie sollte klären, wann und wie stark die sogenannte MAHA-Reaktion ausgebildet wird und ab wann Interaktionsreaktionen auftreten können und welche Auswirkungen diese Reaktionen auf das Verhalten haben.

#### 4.2 Ausgangslage/ Studienlage

Erstmalig 2001 wurde eine MAHA-Reaktion durch die Arbeitsgruppe Imboden et al. gemessen und beschrieben. Im Rahmen einer Untersuchung zur Expression eines Rezeptors nach Behandlung mit einem humanisierten Antikörper (Fusionsprotein), konnte die Arbeitsgruppe nach fünftägiger Behandlung mit dem humanisierten Antikörper (~98% IgG<sub>1</sub>) eine Abnahme der Aktivität natürlicher

Killerzellen im Serum nachweisen. Vorangegangen war ein Anstieg bis zum Behandlungstag 3. Daraufhin führte die Arbeitsgruppe von Imboden einen ELISA auf MAHA durch, um mögliche Komplexbildung beurteilen zu können und damit den Abfall der Aktivität der NK-Zellen zu erklären: Es wurde die Entstehung einer MAHA-Antwort nach vier Tagen bzw. nach drei Injektionen à 15µg mit dem humanisierten Antikörper beschrieben. In den ersten beiden Tagen ließ sich keine MAHA-Antwort nachweisen. Im weiteren Verlauf des Versuchs nahm die MAHA-Antwort bis zur letzten Blutentnahme am Tag sieben (zwei Tage nach der letzten IVIG-Injektion) stetig zu.

Bei einer zweiten Bolusbehandlung der Mäuse im weiteren Verlauf (drei Wochen nach der fünftägigen Behandlung) mit diesem humanisierten Antikörper wurden diese rasch von den gebildeten murinen Antikörpern durch Komplexbildung aus dem Blutkreislauf eliminiert. So ließ sich dieser zwei Stunden nach der Injektion des humanisierten Antikörpers bereits nicht mehr im Serum nachweisen (Imboden et al., 2001).

In einer neueren Veröffentlichung aus dem Jahr 2012 von Loeffler et al. wurde eine MAHA-Reaktion auf rezidivierende IVIG-Injektionen an 27 männlichen C57/B6J-Mäusen gemessen. Den Tieren wurde wöchentlich für eine Dauer von sechs Wochen 1g/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Es wurde bei nahezu 90% der immunkompetenten C57/Bl6 Mäuse eine volle Immunreaktion mit Bildung von MAHA gemessen. Nach der dritten Injektion war die MAHA-Konzentration 23fach erhöht gegenüber dem Ausgangswert. Auch diese konnten mithilfe des MAHA-ELISA nachgewiesen werden (Loeffler et al., 2012). Untersucht wurden neben der MAHA-Reaktion im Serum außerdem hämatologische Aspekte, wie die Zusammensetzung der Blutbestandteile sowie Nierenretentionsparameter zur Beurteilung der Nierenfunktion. Ein aussagekräftiges Ergebnis fand sich nicht. Es zeigte sich ein unspezifischer Abfall der weißen und roten Blutkörperchen, des Hämoglobinwertes und des Hämatokrits. Der Serumharnstoff zeigte hingegen einen unspezifischen Anstieg über die Versuchsdauer von sechs Wochen. Eine histologische Untersuchung auf Veränderungen an Herz, Milz, Leber und Niere erbrachte ebenfalls keinen Nachweis einer Anomalität.

In einem aktuellen Artikel veröffentlicht von Loeffler et al. im Jahr 2014 diskutieren Loeffler et al. die in 2012 gewonnenen Informationen erneut. Es wurde eine Follow-up-Studie mit 20 diesmal weiblichen C57/B6J-Mäusen zur Evaluation der hämatologischen Ergebnisse angeschlossen. Die zweite Studie erbrachte jedoch keinerlei hämatologische Veränderungen, so dass die in der ersten Studie gewonnenen Ergebnisse nachträglich eher als physiologische Schwankungen gewertet wurden, als eine spezifische Reaktion auf die IVIG-Behandlung (Dass et al., 2014).

Laut aktueller Datenlage sind die spezifischen Wirkmechanismen von IVIG noch immer nicht ausreichend geklärt und noch liegen keine weiteren Informationen für die Reaktion von IVIG in Wildtyp-Mäusen vor.

Neben den o.g. Studien, die den Schwerpunkt auf die immunologische Reaktion gelegt haben, gibt es keinerlei spezifische Untersuchung des Einflusses von IVIG auf das Verhalten von Versuchsmäusen. Provozierte Änderungen im Verhalten sind als *in vivo*-Reaktion die wichtigste Auswirkung einer Therapietestung. Daher stellte sich uns die Frage, wenn IVIG als Therapieoption in diversen neurodegenerativen Erkrankungen getestet wird, inwieweit die bereits beschriebene MAHA-Antwort das Verhalten moduliert bzw. mit diesem interferiert. Loeffler et al. beschreibt 2012, dass bei täglicher Beobachtung des Verhaltens keinerlei klinische Anomalitäten beobachtet werden konnten. Dies wurde jedoch im Hinblick auf die sogenannten Serumsickness evaluiert. Es sind keine evaluierbaren Tests aufgeführt anhand derer man Änderungen des Verhaltens verifizieren könnte. Zur Beurteilung der MAHA-Reaktion wurden mit Augenmerk auf die Verhaltensversuche für unsere Arbeit somit verschiedene Parameter ausgewählt: Hinsichtlich des vermehrten Einsatzes von IVIG auch im Patienten wurde das grundlegende Verhalten, sowie Lernen und Gedächtnis als komplexere Verhaltensweisen in diese Versuchsreihe integriert.

Das Körper- und Milzgewicht dienten als physiologische Parameter zur Ermittlung des Immunstatus vergleichbar mit der Studie von Loeffler et al. 2012.

Die immunologische Reaktion wurde anhand der MAHA gegen IgG<sub>1</sub> im Blutserum wie bereits von Imboden et al. und Loeffler et al. beschrieben gemessen. Wir haben unsere Untersuchungen hinsichtlich der Forschung im Bereich der



neurodegenerativen und -psychologischen Studien um die Bestimmung der MAHA im Gehirn ergänzt. Die MAHA-Konzentrationen wurden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, mittels vorbeschriebenem ELISA gemessen.

#### 4.3 Einfluss der IVIG-Therapie auf das Verhalten von C57/B6J-Mäusen

Zur Untersuchung des Verhaltens wurden mit dem Openfield und dem Y-Maze zwei Verhaltensversuche integriert, welche die grundlegenden Verhaltensweisen, wie die motorische Aktivität und das Erkundungs- und Vermeidungsverhalten, sowie komplexere Verhaltensweisen wie Lernen und die räumliche Gedächtnisleistung analysieren.

Die Untersuchung von adulten weiblichen C57/B6J-Mäusen über eine Versuchsdauer von zwölf Wochen zeigte keinen signifikanten Einfluss der IVIG-Behandlung auf das Verhalten der Tiere.

##### 4.3.1 Einfluss der IVIG-Therapie auf das Explorationsverhalten im Openfield

Der durchgeführte Openfield-Versuch konnte keinen signifikanten Einfluss der IVIG-Therapie über elf Wochen Behandlungsdauer auf das Lokomotions- und Explorationsverhalten der Versuchsmäuse nachweisen.

Dennoch gibt es Unterschiede zwischen den Gruppen und Zeitpunkten innerhalb des betrachteten Behandlungszeitraumes. Bezüglich der horizontalen Aktivität wurde eine verringerte Wegstrecke in Woche 5 gemessen ohne dass dies ein Korrelat in dem prozentualen Anteil in der zentralen Region hat. Hinsichtlich der vertikalen Aktivität zeigte sich lediglich ein zunehmender Trend im Aufrichtverhalten in der zentralen Region über die gesamte Versuchsdauer. Interessant hierbei: Gleichzeitig mit dem Anstieg der MAHA-Antwort im Serum zwischen Woche 8 und 9 steigt auch das Aufrichtverhalten in der zentralen Region bei den IVIG-behandelten C57/B6J-Mäusen steil an. Aus Abbildung 10, S. 47 kann entnommen werden, dass die gelaufene Wegstrecke im Openfield in der IVIG-behandelten Versuchsgruppe korrelierend dazu ab Woche 9 die der Kontrollgruppe übersteigt, ohne dass hier ein statistischer Trend detektiert werden konnte.

Das Aufrichtverhalten ist eine instinktive Verhaltensweise, welche dem Nager dazu dient, sich eine Übersicht über die nähere Umgebung zu verschaffen. Um den Einfluss äußerer Faktoren zu minimieren, hat die Versuchsleitung den Raum verlassen und das Openfield nach jedem Versuch mit Alkohol gesäubert, um olfaktorische Reize zu eliminieren. Wir gehen in diesem Versuch also von gleichen Versuchsbedingungen für jede Maus aus, so dass ein äußerer Einfluss als Ursache für den beobachteten Trend nahezu ausgeschlossen werden kann (die Ausnahme bildet Woche 5). Bei gleichen externen Faktoren kann nur ein innerer Einfluss, wie zum Beispiel Angst, die Steigerung des Erkundungsverhaltens der Maus bewirken. Gesteigertes Aufrichtverhalten korreliert mit einem erhöhten Angstniveau als emotionalem Einfluss (Crawley et al., 1997, Katz et al., 1981, Liebsch et al., 1998). Auch *in vivo* wurde bei Patienten nach IVIG-Gabe eine erhöhtes Angstniveau beobachtet (persönliches Gespräch mit Prof. Dr. Dodel, (Aghamohammadi et al., 2003)).

#### 4.3.2 Einfluss der IVIG-Therapie auf komplexere Verhaltensweisen und das Gedächtnis im Y-Maze

Auch im zweiten Verhaltensversuch, dem Y-Mazeversuch konnte im Rahmen dieser Studie kein Einfluss der IVIG-Behandlung auf das Alternierungsverhalten nachgewiesen werden. Folglich nimmt eine IVIG-Behandlung über elf Wochen keinen Einfluss auf das räumliche Orientierungsverhalten und das Arbeitsgedächtnis.

Bei näherer Betrachtung der Werte kann auch hier eine Abnahme der gelaufenen Wegstrecke ab Woche 9, in der die maximal gelaufenen Wegstrecke erreicht wird, innerhalb der mit IVIG behandelten Gruppe beobachtet werden. Ein statistisches Korrelat findet sich hierzu nicht (s. Abbildung 16, S.54)

Ein statistischer Trend ist aber bei der verbrachten Zeit in den Armen des Y-Maze festzustellen. Mit Beginn der MAHA-Antwort im Serum ab Woche 9 ist hier ein deutlicherer Anstieg in der IVIG-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen (s. Abbildung 17, S.55). Die Arme des Y-Maze stellen eine geschützte Region dar. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erläutert, korreliert eine erhöhte Aufenthaltsdauer in geschützten Regionen mit einem erhöhten Angstniveau (Bats et al., 2001, Lalonde, 2002). Zusammen mit der oben

beschriebenen verkürzten gelaufenen Wegstrecke spricht dies folglich für vermehrtes Verharren der Versuchstiere und Sicherung der Umgebung und ist damit ebenfalls ein Indikator für ein erhöhtes Angstniveau. In dieser Konstellation wäre eine zusätzliche Messung des Aufrichtverhaltens interessant gewesen. Bei einem erhöhten Angstniveau wäre ein vermehrtes Aufrichten zu erwarten.

#### 4.3.3. Zusammenfassende Ergebnisdiskussion der Verhaltensversuche

Den einzelnen Signifikanzen können aufgrund des fehlenden Verlaufs keine biologische Relevanz zugesprochen werden. Dennoch sollte erwähnt werden, dass es zu verschiedenen Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen gegeben hat. Betroffen waren hier größtenteils Werte der Woche 5. Hier fand sich im Openfield ein deutlicher Einbruch in der gelaufenen Wegstrecke, im Y-Maze eine reduzierte Anzahl an Armeintritten sowie eine schwach verringerte Aufenthaltsdauer in den Y-Maze-Armen. Dieser klare Einbruch der gemessenen Parameter in Woche 5 unseres Beobachtungszeitraumes ist im Vergleich mit den Daten der anderen Versuchswochen sehr ungewöhnlich.

Dieser Einbruch ist in Zusammenhang mit den unglücklicherweise stattgefundenen baulichen Maßnahmen an der Abgasfilteranlage im Inneren unserer Tiereinrichtung zu sehen. Dabei gehen wir davon aus, dass aufgrund der erhöhten Umgebungslautstärke, verbunden mit einem Ortswechsel der Versuchstiere in einen anderen Tierstall, die Versuchsmäuse mit einem erhöhten Angstniveau die Verhaltensversuche durchlaufen haben. Möglicherweise ist dies die einfachste und plausibelste Erklärung für die abweichenden Ergebnisse und das erhöhte Angstniveau der Tiere.

Da sich die Werte der Verhaltensversuche in der Folgewoche auf ein ähnliches Aktivitätsniveau wie vor dem Umzug eingependelt haben, postulieren wir eine stattgefundenene Habituation. Dies stützt die Vermutung, dass der Einbruch der Werte mit diesem zeitlich begrenzten Ereignis in Verbindung steht. Vergleiche zu anderen vorangegangenen Studien sind nicht möglich, da bis dato keine Verhaltensversuche im Zusammenhang mit IVIG-Therapie durchgeführt wurden.

Die beschriebenen signifikanten Unterschiede sind vielmehr für die statistische Betrachtung erwähnenswert. Die biologische Bedeutung für die Überprüfung unserer Arbeitshypothese ist zu vernachlässigen, da in beiden Behandlungsgruppen zwischen der ersten und der letzten Behandlungswoche kein signifikanter Unterschied in der lokomotorischen Aktivität im Openfield und dem spontanen Alternierungsverhalten im Y-Maze-Versuch zu detektieren war. Sie spiegelt vielmehr die Variabilität der Reaktionen und Verhaltensweisen von Tieren auf externe unspezifische Reize wider (Lathe, 2004).

Wir konnten keine Änderung des Verhaltens sowie keine Verschlechterung oder Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten durch eine Behandlung mit IVIG nachweisen. Vergleichen wir dieses Ergebnis mit der Studie von Loeffler 2012 so kann man zumindest im Hinblick auf die „serum sickness“, also auf die systemischen Auswirkungen der Immunreaktion ein ähnliches Ergebnis postulieren.

#### 4.3.4 Diskussion der Verhaltensmethoden

In den Untersuchungen zum Explorations- und Ängstlichkeitsverhalten im Openfield und dem Kurzzeitarbeitsgedächtnis im Y-Maze-Versuch wurde der Fokus auf grundlegende Komponenten gelegt.

Verhalten ist eine Vernetzung verschiedener komplexer Abläufe in unterschiedlichen Gefügen, welche vielfältigen internen und externen Einflüssen und Eigenschaften unterliegen. Es ist zwar nachgewiesen, dass bestimmte interne und externe Einflüsse das Angstniveau und damit das Verhalten der Mäuse beeinflussen; ein direkter Einfluss durch die getestete Behandlung konnte bei den hier durchgeführten Verhaltensversuchen jedoch nicht nachgewiesen werden (Bats et al., 2001).

Genetische Komponenten als interne Faktoren sind gekoppelt mit der generellen Regulation der lokomotorischen Aktivität, des Erkundungsverhaltens, dem Geruchs-, Hör- und Sehsinn, ebenso wie mit Emotionen, wie Angst und Unruhe. Kein alleiniges, der in den Verhaltensversuchen üblicherweise gemessenen Verhaltensmerkmale, kann Ängstlichkeit oder emotionale Reaktivität

widerspiegeln (Crawley, 1985, Crawley et al., 1997, Crawley, 2007, Denenberg, 1969). Erfassbar sind lediglich die Folgeerscheinungen, die an den Verhaltensänderungen des Versuchstieres zu beobachten sind. Einzelne Komponenten der komplexen Verhaltensweisen können objektiviert und gemessen werden (z.B. gelaufene Wegstrecke, Aufrichtverhalten, Aufenthaltsdauer in definierten Regionen, usw.). Der Openfield-Test als solcher kann nur Hinweise auf unterschiedliches Angstverhalten durch die Auswertung von Laufmustern und Aufenthaltsorten sowie des Aufrichtens geben.

Ein weiteres Problem ist die anschließende Interpretation der gewonnenen Daten. So gibt es in der Literatur unterschiedliche Ansichten in der Bewertung der lokomotorischen Aktivität. Lister empfiehlt, die Lokomotion nicht als „Index der Angst“ zu betrachten (Lister, 1990). Jedoch verursachen Angst und Schmerzen oft das sogenannte „Freezing“ (die Maus bewegt sich nicht mehr) und damit eine Verringerung der lokomotorischen Aktivität (Gerlai, 1996).

Die Heterogenität der gemessenen Werte ist neben der Individualität der Tiere auch auf die technischen Limitierungen der Versuchsaapparatur zurückzuführen. So kann die Auswertung erschwert sein, wenn die Maus langsam oder wenig läuft. Hierbei kann es zur erschweren oder fehlerhaften Detektion des Tieres kommen. Sollte eine Maus es sogar schaffen die Versuchsaapparatur zu verlassen, kann die Detektion ebenfalls nicht fortgesetzt werden.

Eine weitere Einschränkung der verhaltensbeobachtenden Methoden liegt in der Frage, inwieweit die in Tierversuchen erhaltenen Befunde auf den Menschen übertragbar sind. Es gibt bis heute kein Tiermodell, welches adäquat diagnostische Kriterien und Behandlungsergebnisse vom Menschen nachahmen kann. Probleme bestehen bei jeder Art von Tierversuchen unter Laborbedingungen, da man die Tiere im unnatürlichen Lebensraum hält und untersucht. „Konstruierte“ Angstversuche an Labornagern können in Bezug auf die verschiedenen meist unvollständig geklärten menschlichen Angsterkrankungen deshalb nur Kompromisse darstellen (Lister, 1990).

Interessant hinsichtlich der hier untersuchten Frage wäre neben einer Studie mit vergleichbaren Untersuchungen, eine Studie, die über zwölf Wochen hinaus Mäuse hinsichtlich des weiteren Verlaufs ihres Verhaltens unter wöchentlicher

IVIG-Therapie beobachtet. Der Fragestellung, ob sich verzögert auf die nachgewiesene MAHA-Reaktion eine Verhaltensänderung ergibt, könnte somit nachgegangen werden. Weiterhin würden Untersuchungen von komplexeren Verhaltensvorgängen, wie zum Beispiel räumliches Denken und Gedächtnis oder emotionales Lernen mit Gedächtnis Erkenntnisse über Auswirkungen von IVIG-Behandlung auf höhere kognitive Funktionen erbringen. Andere Versuchsansätze zu den untersuchten Gedächtnisleistungen, wie z.B. das Morris Watermaze könnten weitere Ergebnisse zum Vergleich liefern (D'Hooge and De Deyn, 2001, Morris, 1984). Aufgrund der zeitlichen und technischen Limitierung konnte im Rahmen dieser Arbeit trotz Kenntnis des knappen Umfangs nur ein geringer Teil des Verhaltens untersucht werden.

#### 4.3.5 Diskussion bezüglich der Versuchstiere

In Verhaltensuntersuchungen werden immer die Reaktionen des Gesamtorganismus betrachtet. Für eine sichere Vergleichbarkeit von Verhaltensuntersuchungen ist es somit notwendig, die inneren und äußeren Einflüsse auf die Mäuse maximal zu vereinheitlichen. Pränatale Einflüsse unserer Versuchsmäuse sind weder bekannt, noch aktuell beeinflussbar. Intrauterine Einflüsse prägen das spätere Verhalten und sind für die Individualität der Mäuse verantwortlich (Kastenberger et al., 2012, Ryan and Vandenberg, 2002). Eine Entwicklung der Tiere unter möglichst ähnlichen Bedingungen kann weitere Einflussvariablen ausschalten (Kastenberger et al., 2012). Daher haben wir sowohl den gleichen Stamm verwendet als auch die Versuchsmäuse von nur einem Züchter bezogen. Aufgrund der Erkenntnis, dass weibliche Mäuse weniger aggressiv sind als ihre männlichen Artgenossen, wurden 110 weibliche C57/B6J für diese Studie ausgewählt. Die äußeren Umwelteinflüsse, welche das Verhalten prägen, wurden in unserem Versuch, ebenso wie die oben aufgeführten Einflussfaktoren möglichst stressfrei für die Versuchstiere gestaltet und die Mäuse beider Gruppen in Fünfer-Gruppen gehalten, bei einem zwölfstündigen Tag- und Nachtwechsel.

Vor und während den Untersuchungen können externe Stressfaktoren und andere, spezielle Testsituationen beeinflussende, Faktoren ausgeschlossen

bzw. ausgeschaltet werden. Während der Versuchsdurchführung wurden so olfaktorische (Reinigung nach jedem Versuchstier) und akustische Einflüsse (Versuchsleitung verließ den Raum) weitestgehend minimiert.

Eine Ausnahme bildet die bereits beschriebenen Umbauarbeiten innerhalb der Versuchswoche 5. Sowohl der Ortswechsel mit begleitender Änderung der Lautstärke und Geruchsempfindung hat die Tiere offensichtlich beeinflusst. Diese Änderungen stellen einen enormen externen Reiz auf die Versuchstiere dar. Dieser betraf alle noch lebenden Versuchstiere gleichermaßen. Dies spiegelt sich auch in den erhobenen Ergebnissen der Woche 5 wieder. Die Vergleichbarkeit der Daten kann nur im Vergleich zu den Ergebnissen der Wochen 1-4 in Frage gestellt werden. Da bereits in Woche 6 wieder ein ähnliches Aktivitätsniveau wie vor dem Umzug in Woche 4 erreicht wurde, kann ausgeschlossen werden, dass diese Maßnahme Einfluss auf das gesamte weitere Verhalten hat.

#### 4.4. Körper- und Milzgewicht

Das Körper- und Milzgewicht wurde als physiologischer Parameter der Immunantwort herangezogen, da bei der humoralen Immunantwort die Antigenpräsentation in den sekundär lymphatischen Organen stattfindet. Ausgehend von der Annahme, dass bei übermäßiger Immunreaktion die Milz stark an Volumen zunimmt, haben wir das Milz- und Körpergewicht als Verlaufsparemeter herangezogen.

Die Mäuse kamen im Alter von sechs bis acht Wochen in die tiermedizinische Einrichtung und hatten nach elf Wochen Beobachtungszeitraum ein Alter von ca. 17-19 Wochen erreicht. Über diese Versuchsperiode sind Körper- und Milzgewicht signifikant angestiegen.

Dieser signifikante Anstieg des Körper- und Milzgewichtes der weiblichen C57/B6J-Mäusen ist unabhängig von der Behandlungsart womit man einen Einfluss der IVIG-Behandlung auf die immunologische Funktion der sekundär lymphatischen Organe, wie z. B. der Milz, ausschließen kann. Die bestimmten Signifikanzen lassen sich mit dem natürlichen Wachstum und der Organreifung in diesem Alter erklären.

Bereits die Studie von Loeffler et al. 2012 maß das Körpergewicht der Versuchstiere, in dem Fall männliche C57/B6J-Mäuse. Es wurde eine Gewichtszunahme über die 43 Tage Versuchsdauer von wenigstens 2g verzeichnet ohne Hinweis auf eine Anomalität. Diese Werte sind mit unseren erhobenen Werten kongruent. Im Durchmesser wurde in beiden Gruppen ein Zuwachs von 3g gemessen. Auch der errechnete prozentuale Anteil der Milz am Körpergewicht zeigte keinerlei Entwicklung.

#### 4.5 MAHA-Antwort nach rezidivierenden IVIG-Injektionen über elf Wochen Versuchsdauer

Nach einer IVIG-Behandlung über elf Wochen bildeten alle weiblichen C57/B6J-Mäuse vom Wildtyp, wie erwartet, MAHA gegen humane Ig aus.

Die humorale, auch erworbene Immunantwort genannt, ist eine hoch spezifische Immunreaktion auf ein bestimmtes Antigen. Nach dem spezifischen Erkennen des fremden Antigens wird dieses in die sekundär lymphatischen Organe transportiert und dort den antigenspezifischen Lymphozyten präsentiert. Diese werden durch die Identifizierung ihres spezifischen Antigens aktiviert. Es kommt zur Differenzierung von Antikörpern, wobei die Lymphozyten zu Effektorzellen werden, welche über das Blutssystem die Pathogene eliminieren. Neben der Bildung von Antikörpern kommt es zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches beim erneuten Kontakt mit dem gleichen oder einem ähnlichen Erreger eine deutlich beschleunigte Rekrutierung spezifischer Effektorzellen und Antikörperbildung erlaubt. Die Immunreaktion bei Erstkontakt dauert über drei Tage und schließt damit an die angeborene unspezifische Sofortreaktion an.

##### 4.5.1 MAHA-Antwort im Serum

Der Nachweis von MAHA im Serum erfolgte bereits sechs Tage nach der ersten IVIG-Injektion in Folge der ersten Datenerhebung. Die gemessene MAHA-Konzentration stieg danach leicht auf ein niedriges Niveau an und hielt sich die ersten acht Wochen auf diesem Niveau (s. Abbildung 20, S.60). Der Mechanismus der humoralen Immunantwort erklärt, warum in unserem Versuch



nach der ersten Behandlungswoche ein geringer Anstieg der MAHA-Antwort zu sehen war und warum die ersten MAHA in den Studien von Loeffler et al. und Imboden et al. erst vier Tage nach den IVIG-Injektion nachgewiesen werden konnten.

Vergleichend mit den beiden bereits vorangegangenen Studien von Imboden et al. und Loeffler et al. sind die gewonnenen Ergebnisse vergleichbar.

Imboden et al. der 2001 erstmalig eine MAHA-Reaktion auf Injektion eines humanisierten Fusionsproteins gemessen hat, wies nach täglicher Injektion des Antigens (also nach 3 Injektionen) die erste MAHA am 4. Tag im Serum von Balb-c-Mäusen nach. An Tag 2 nach der ersten Injektion konnten noch keine MAHA nachgewiesen werden. Der höchste gemessene Titer der MAHA wurde an Tag 7 (zwei Tage nach der letzten von fünf Injektionen) gemessen. Hier war ein Anstieg auf das 4000fache erhoben worden.

Loeffler et al. welcher im Jahr 2012 ebenfalls die MAHA-Reaktion auf IVIG testete entschied sich analog zu unserer Studie zu wöchentlichen Injektion über einen Zeitraum von 6 Wochen. Loeffler erhob jedoch nur zu 3 Zeitpunkten die MAHA-Reaktion: erstmalig wurde vor der Behandlung ein Ausgangswert bestimmt und anschließend an Tag 21 (sechs Tage nach der dritten Injektion) und Tag 43 (sechs Tage nach der sechsten Injektion). Hier wurde lediglich ein Anstieg der MAHA prozentual zum Ausgangswert beschrieben: An Tag 21 hatten 89% aller Mäuse eine Antikörperreaktion größer dem 4fachen des Ausgangswertes gebildet, 45% der Mäuse sogar eine Vervielfältigung um das 10-30fache. An Tag 43 konnte bei 88% der Mäuse mit einer Antwort von >4fachem des Ausgangswertes von Tag 0 gemessen werden. An Tag 43 zeigten ca. 60% aller Mäuse eine Vervielfältigung der MAHA bezüglich des Ausgangswertes vom 10-30fachen, über die Hälfte dieser Gruppe sogar > 50fache des Ausgangswertes.

In unserer Studie zeigte sich nach drei Wochen, folglich nach drei Injektionen ein Anstieg der MAHA in der IVIG-behandelten Gruppe auf das Dreifache des Wertes nach der ersten Injektion. Da wir keinen Ausgangswert erhoben haben, bleibt uns lediglich dieser Vergleich. Dieser Unterschied begründet sich auch auf die injizierte Menge: Während Loeffler et al 1g/kg Körpergewicht applizierte, was analog zu den Gewichten unserer Versuchstiere über die Versuchsdauer

zwischen 22-25mg entspricht, wurde in unserem Versuch lediglich eine Menge von 400µg verabreicht.

Nach dem geringen Anstieg der MAHA in den ersten acht Beobachtungs-wochen als Reaktion auf die IVIG-Behandlung, konnte ab Woche 9 in der IVIG-behandelten Gruppe einen steilen Anstieg der MAHA verzeichnet werden. Nach der sechsten Injektion zeigte sich in unserem Versuch eine Vervielfältigung des Wertes der ersten Woche auf das Siebenfache. Ab Woche 9 ist bei uns eine Zunahme auf das >10fache des Wertes der ersten Woche zu verzeichnen. Die MAHA stiegen insgesamt von durchschnittlich 4,93ng/ml in Woche 1 auf 2645,95ng/ml in Woche 11 an. Dies entspricht einer Progression auf >500fache des Ausgangswertes.

Unsere Kenntnis über die Mechanismen der humoralen Immunabwehr, in Zusammenschau mit den vorbeschriebenen Studien, lassen den Schluss zu, dass es sich bei den nachgewiesenen Antikörpern um sogenannte MAHA handelt, welche spezifisch gegen IVIG gerichtet sind. Die vorher abgelaufene angeborene Immunantwort wurde in unserem Versuch nicht berücksichtigt. Wir gehen davon aus, dass diese die humorale Immunreaktion sowie unseren Nachweis der murinen Antikörper nicht beeinflusst. Durch die wiederholten Injektionen wurden, ab der zweiten Injektion bereits, die Gedächtniszellen aktiviert Antikörper gegen das humane Antigen freizusetzen, die sogenannten MAHA.

#### 4.5.2 MAHA-Antwort im Gehirn

Um die Ausmaße der Immunreaktion beurteilen zu können, haben wir das Serum und Gehirn der Versuchstiere auf MAHA untersucht. Die Auswertung der ZNS-ELISA konnte, wie erwartet, keine MAHA-Reaktion im Gehirn nachweisen (s. Tabelle 8). Hierzu gibt es nach unserem Wissen keine weiteren Studien zum Vergleich.

Die Blut-Hirn-Schranke bildet eine immunologische Barriere und dient als selektiver Filter. Sie schützt das Gehirn vor im Blutkreislauf zirkulierenden Pathogenen. Auch bei angestiegenen MAHA-Werten im Serum auf ca. das

500fache bleibt die Schutzfunktion der Blut-Hirn-Schranke intakt und die gebildeten MAHA können nicht auf das ZNS übergreifen.

Bei vorliegender MAHA-Reaktion im Serum könnte man, ebenso eine ansteigende Antikörperkonzentrationen im ZNS im Verlauf der Versuchsdauer, äquivalent zu den Serumwerten erwarten. Wie werten wir die gewonnenen Daten, also die erhöhten Messwerte in Woche 6, 7, 8 und 11 beider Gruppen als Artefakte, zum Beispiel durch Verunreinigungen. Als Ursache für die Artefakte können Material- und Substanzunterschiede sowie Schwankungen in den Laborbedingungen ausgeschlossen werden.

#### 4.5.3 Zusammenfassende Ergebnisdiskussion der murinen Immunreaktion nach IVIG-Therapie

Wir weisen eine manifeste murine Immunreaktion auf eine IVIG-Behandlung in C57/B6J-Mäusen nach. Die Ausbildung von MAHA startet zögerlich und nimmt ab Woche 8 zu. Der geringe Anstieg der Antikörper nach den ersten Behandlungswochen spiegelt die Erkenntnisse von Löffler et al. und Imboden et al. wider. In allen drei durchgeführten MAHA-ELISA bei immunkompetenten Mäusen konnten MAHA nach frühestens vier Tagen nachgewiesen werden. Da keine der Studien länger als 43 Tage dauerte, ist der starke Anstieg der MAHA ab Woche 8 bis dato unbeschrieben (Imboden et al., 2001).

Ausgehend von der Tatsache, dass MAHA mit therapeutischen humanen Antikörpern interagieren und Komplexe bilden (Imboden et al., 2001) und diese Antigen-Antikörperkomplexe in der Milz aus der Blutbahn gefiltert werden, haben wir das Milzvolumen als physiologischen Parameter für eine Immunreaktion bestimmt. Das Volumen der Milz wurde über das Gewicht bestimmt. Bei vermehrter Komplexbildung vermuteten wir eine vermehrte Ablagerung von Komplexen in der Milz und bei gesteigerter Aktivität damit auch eine Volumenzunahme der Milz.

Es konnte eine Gewichtszunahme im absoluten Gewicht verzeichnet werden, das relative Gewicht hingegen blieb auf einem Niveau. Folglich führen wir diese

Volumenzunahme in beiden Versuchsgruppen auf das natürliche Körperwachstum der Mäuse zurück.

Wir haben den Verlauf der Immunreaktion aufgrund des Studiendesigns innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen betrachtet, da in unserem Studiendesign keine zwei Therapiemöglichkeiten verglichen werden. Die zweite Gruppe ist eine reine Kontrollgruppe, von der wir keine MAHA-Reaktion erwarten. Sie dient als Referenzgruppe. Daher vergleichen wir unsere gewonnenen Daten über die Versuchsperiode immer mit den Ausgangswerten der jeweiligen Behandlungsgruppe, um einen Verlauf erkennen und beurteilen zu können. Da wir mit Tieren arbeiten, welche einem individuellen Polymorphismus (z. B. des Fc-Rezeptors) unterliegen, sind individuelle Werte gesondert zu betrachten und haben somit keine biologische Relevanz.

#### 4.5.4 Diskussion der immunologischen Techniken

Da die MAHA- Ergebnisse im Serum der beiden vorbeschriebenen Studien mit unseren bis zur Woche 6 vergleichbar sind, können verfahrenstechnische Fehler nahezu ausgeschlossen werden. Die von der Maus gebildeten IgG-Antikörper konnten durch den MAHA-ELISA nachgewiesen werden. Wir gehen davon aus, dass eine unspezifische Bindung lediglich in geringem Ausmaß stattgefunden und damit mit der Messung interagiert hat. Möglicherweise könnten gebildete IgM-Antikörper unserem Nachweis entgangen sein, da diese mit unserem Detektionsantikörper nicht gebunden werden.

Die humorale Immunantwort unterliegt einem IgM-IgG-Klassen-Switch, wobei IgM der IgG-Bildung vorausgehen. IgM ist das Immunglobulin, welches im Rahmen der humoralen Immunantwort am frühesten gebildet wird. Hauptaufgaben des IgM sind Agglutination und Neutralisation der Fremdartigene sowie die Aktivierung des Komplementsystems. Durch die mehrfach wiederholte Gabe des IVIG gehen wir jedoch davon aus, dass sich ein immunologisches Gedächtnis gebildet hat, welches bei erneutem Kontakt mit IVIG als körperfremdem Antigen direkt in der Lage ist, spezifische IgG zu produzieren und

ins Serum auszuschwemmen. Damit wäre der Anteil der IgM an der gesamten Antikörpermasse vernachlässigbar gering.

Aufgrund der sogenannten molekularen Mimikry kann es unter anderem durch Ähnlichkeit von Molekülen zu Kreuzreaktionen kommen, welche das Messergebnis beeinflussen können. Dies gilt auch für den im vorherigen Abschnitt erwähnten Polymorphismus (Blank et al., 2007b).

IVIG wird aus dem Plasma mehrerer tausend Spender gewonnen. Bevor es zu einem Medikament wird, wird es mittels Ethanol-Fraktionierung bei geringem pH-Wert (Cohn-Fraktionierung) aufbereitet. Mit dieser Methode ist die Separierung von Immunglobulinen jedoch nicht zu 100% möglich. So können IVIG-Präparate Spuren von weiteren potentiell immunregulatorischen Stoffen enthalten, wie z. B. Zytokine. Ein immunmodulierender Effekt dieser Stoffe kann folglich weder ausgeschlossen noch in unserem Studiendesign nachgewiesen werden (Blasczyk et al., 1993, Lam et al., 1993).

Die Messung der Milzgewichte erbrachte nicht die erwartete Zunahme des relativen Milzgewichtes bei Zunahme der MAHA im Serum. Erwartet haben wir aufgrund der Komplexbildung zwischen humanen Immunglobulinen und MAHA eine Größenzunahme der Milz mit relativer Volumenzunahme im Bezug zum Körpergewicht. Da diese trotz nachweisbarer MAHA-Reaktion im Körper ausgeblieben ist, könnte eine histologische Aufbereitung der Milz, bzw. der Nachweis der Antigen-Antikörperkomplexe neue Erkenntnisse liefern.

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass eine Behandlung von IVIG in Wildtypmäusen im Rahmen einer präklinischen Studie über zwei Monate ethisch und wissenschaftlich gesehen möglich ist.

#### 4.6 Weiterführende Studien

Über die gewonnenen Erkenntnisse hinaus wäre es interessant zu erfahren, wie die MAHA-Produktion nach den elf Wochen Behandlungszeitraum aussieht und wie folgende Fragen beantwortet werden könnten:

1. Würde die Konzentration weiter ansteigen oder wäre bereits nach elf Wochen das Maximum erreicht?
2. Bildet sich nach weiteren Behandlungswochen eine generalisierte Immunreaktion mit einer sogenannten Serumkrankheit aus, welche Loeffler et al. bereits nach sechs Wochen IVIG-Behandlung vermutete? Und wenn ja, kommt es zum Schaden der Blut-Hirn-Schranke mit Übertritt von MAHA ins ZNS?
3. Weiterhin wäre es interessant, ob und wenn ja ab welcher Behandlungsdauer oder Gesamtmenge an IVIG eine komplette Neutralisierung der MAHA-Antikörper erfolgt.

#### 4.7 Ausblick

Svetlicky et al. veröffentlichte kürzlich einen Review über Studien, in denen beschrieben wird, dass spezifische Intravenöse Immunglobuline (sIVIG) besser wirken als die üblichen IVIG-Präparate, welche auch in dieser Studie angewendet wurden.

sIVIG sind spezifische Subfraktionen, welche aus IVIG-Präparaten gewonnen werden und gezielt bei bestimmten Erkrankungen eingesetzt werden. sIVIG-Präparate wurden bereits erfolgreich *in vitro* und *in vivo* bei Lupus, Anti-phospholipid-Syndrom, Myasthenia gravis und Pemphigus vulgaris eingesetzt und wirken funktionell potenter. Hier könnte man bei bekanntem Wirkmechanismus, jeder Krankheit entsprechend, die spezifischen Antikörper herausfiltern und damit eine höhere Heilungschance ermöglichen (Blank et al., 2007a, Svetlicky et al., 2013).

Auch hier gibt es noch keine Studien bezüglich der Reaktion von sIVIG in Wildtypmäusen. Es wäre hingegen sehr aufwendig, die einzelnen sIVIG-Präparate über eine so lange Zeitdauer in einer repräsentativen Stichprobe zu beobachten. Hierfür wäre unsere Studie eine grundlegende Arbeit, aber da die einzelnen Bestandteile des verwendeten IVIG-Präparates nicht gesondert untersucht wurden, wäre dies für weiterführende Studien notwendig.

## Literaturverzeichnis

---

- HAMA Survey group 1993. Survey of methods for measuring human anti-mouse antibodies. HAMA Survey Group. *Clin Chim Acta*, 215, 153-63.
- AGHAMOHAMMADI, A., FARHOUDI, A., MOIN, M., POURPAK, Z., REZAEI, N., NIKZAD, M., MOVAHEDI, M., GHARAGOZLOU, M., ATAROD, L., AHMADI AFSHAR, A., BAZARGAN, N., ABOLMAALI, K. & MAHMOUDI, M. 2003. Adverse effects of intravenous immunoglobulin therapy in patients with antibody deficiency. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2, 121-6.
- AMAGAI, M., IKEDA, S., SHIMIZU, H., IIZUKA, H., HANADA, K., AIBA, S., KANEKO, F., IZAKI, S., TAMAKI, K., IKEZAWA, Z., TAKIGAWA, M., SEISHIMA, M., TANAKA, T., MIYACHI, Y., KATAYAMA, I., HORIGUCHI, Y., MIYAGAWA, S., FURUKAWA, F., IWATSUKI, K., HIDE, M., TOKURA, Y., FURUE, M., HASHIMOTO, T., IHN, H., FUJIWARA, S., NISHIKAWA, T., OGAWA, H., KITAJIMA, Y., HASHIMOTO, K. & GROUP, P. S. 2009. A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol*, 60, 595-603.
- ASCHERMANN, S., LUX, A., BAERENWALDT, A., BIBURGER, M. & NIMMERJAHN, F. 2010. The other side of immunoglobulin G: suppressor of inflammation. *Clin Exp Immunol*, 160, 161-7.
- AVRAMEAS, S. & GUILBERT, B. 1971a. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur J Immunol*. Weinheim, Verlag Chemie GmbH.
- AVRAMEAS, S. & GUILBERT, B. 1971b. [Enzymo-immunological determination of proteins with the aid of immunoadsorbents and enzyme-labelled antigens]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 273, 2705-7.
- AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T. 1971. Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry*, 8, 1175-9.
- AZINOVIC, I., DENARDO, G. L., LAMBORN, K. R., MIRICK, G., GOLDSTEIN, D., BRADT, B. M. & DENARDO, S. J. 2006. Survival benefit associated with human anti-mouse antibody (HAMA) in patients with B-cell malignancies. *Cancer Immunol Immunother*, 55, 1451-8.
- BARD, F., CANNON, C., BARBOUR, R., BURKE, R. L., GAMES, D., GRAJEDA, H., GUIDO, T., HU, K., HUANG, J., JOHNSON-WOOD, K., KHAN, K., KHOLODENKO, D., LEE, M., LIEBERBURG, I., MOTTER, R., NGUYEN, M., SORIANO, F., VASQUEZ, N., WEISS, K., WELCH, B., SEUBERT, P., SCHENK, D. & YEDNOCK, T. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med*, 6, 916-9.
- BARTH, D., NABAVI NOURI, M., NG, E., NWE, P. & BRIL, V. 2011. Comparison of IVIg and PLEX in patients with myasthenia gravis. *Neurology*, 76, 2017-23.
- BATS, S., THOUMAS, J. L., LORDI, B., TONON, M. C., LALONDE, R. & CASTON, J. 2001. The effects of a mild stressor on spontaneous alternation in mice. *Behav Brain Res*, 118, 11-5.
- BAXTER, L. T., ZHU, H., MACKENSEN, D. G., BUTLER, W. F. & JAIN, R. K. 1995. Biodistribution of monoclonal antibodies: scale-up from mouse to

- human using a physiologically based pharmacokinetic model. *Cancer Res*, 55, 4611-22.
- BAYRY, J., LACROIX-DESMAZES, S., KAZATCHKINE, M. D. & KAVERI, S. V. 2003a. Intravenous immunoglobulin for infectious diseases: tailor-made or universal? *J Infect Dis*, 188, 1610; author reply 1610-1.
- BAYRY, J., MISRA, N., LATRY, V., PROST, F., DELIGNAT, S., LACROIX-DESMAZES, S., KAZATCHKINE, M. D. & KAVERI, S. V. 2003b. Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin in autoimmune and inflammatory diseases. *Transfus Clin Biol*, 10, 165-9.
- BLANK, M., ANAFI, L., ZANDMAN-GODDARD, G., KRAUSE, I., GOLDMAN, S., SHALEV, E., CERVERA, R., FONT, J., FRIDKIN, M., THIESEN, H. J. & SHOENFELD, Y. 2007a. The efficacy of specific IVIG anti-idiotypic antibodies in antiphospholipid syndrome (APS): trophoblast invasiveness and APS animal model. *Int Immunol*, 19, 857-65.
- BLANK, M., BARZILAI, O. & SHOENFELD, Y. 2007b. Molecular mimicry and auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol*, 32, 111-8.
- BLASCZYK, R., WESTHOFF, U. & GROSSE-WILDE, H. 1993. Soluble CD4, CD8, and HLA molecules in commercial immunoglobulin preparations. *Lancet*, 341, 789-90.
- BORA, U., CHUGH, L. & NAHAR, P. 2002. Covalent immobilization of proteins onto photoactivated polystyrene microtiter plates for enzyme-linked immunosorbent assay procedures. *J Immunol Methods*, 268, 171-7.
- BRONIKOWSKI, A. M., CARTER, P. A., SWALLOW, J. G., GIRARD, I. A., RHODES, J. S. & GARLAND, T. 2001. Open-field behavior of house mice selectively bred for high voluntary wheel-running. *Behav Genet*, 31, 309-16.
- CLARK, R. & KUPPER, T. 2005. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*, 125, 629-37.
- COCITO, D., CIARAMITARO, P., ISOARDO, G., BARBERO, P., MIGLIARETTI, G., PIPIERI, A., PROTO, G., QUADRI, R., BERGAMASCO, B. & DURELLI, L. 2002. Intravenous immunoglobulin as first treatment in diabetics with concomitant distal symmetric axonal polyneuropathy and CIDP. *J Neurol*, 249, 719-22.
- CRABBE, J. C. 1986. Genetic differences in locomotor activation in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 25, 289-92.
- CRAWLEY, J. N. 1985. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, 9, 37-44.
- CRAWLEY, J. N. 2007. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol*, 17, 448-59.
- CRAWLEY, J. N., BELKNAP, J. K., COLLINS, A., CRABBE, J. C., FRANKEL, W., HENDERSON, N., HITZEMANN, R. J., MAXSON, S. C., MINER, L. L., SILVA, A. J., WEHNER, J. M., WYNshaw-BORIS, A. & PAYLOR, R. 1997. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 132, 107-24.
- D'HOOGE, R. & DE DEYN, P. P. 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev*, 36, 60-90.
- DALAKAS, M. C., ILLA, I., DAMBROSIA, J. M., SOUEIDAN, S. A., STEIN, D. P., OTERO, C., DINSMORE, S. T. & MCCROSKY, S. 1993. A controlled trial



- of high-dose intravenous immune globulin infusions as treatment for dermatomyositis. *N Engl J Med*, 329, 1993-2000.
- DASS, K. J., SCOTT, M. A., GALOFORO, S. S., LOEFFLER, D. A. & COFFEY, M. P. 2014. Development of antihuman IgG antibodies and hematologic deficits but not clinical abnormalities in C57BL/6 mice after repeated administration of human intravenous immunoglobulin. *Comp Med*, 64, 169-70.
- DEACON, R. M. 2006. Appetitive position discrimination in the T-maze. *Nat Protoc*, 1, 13-5.
- DEMATTO, R. B., BALES, K. R., PARSADANIAN, M., O'DELL, M. A., FOSS, E. M., PAUL, S. M. & HOLTZMAN, D. M. 2002. Plaque-associated disruption of CSF and plasma amyloid-beta (A $\beta$ ) equilibrium in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 81, 229-36.
- DENENBERG, V. H. 1969. Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci*, 159, 852-9.
- DODEL, R. & BACHER, M. 2008. [Innovative treatment approaches for Alzheimer's disease. Immunotherapy]. *Nervenarzt*, 79 Suppl 3, 149-57; quiz 158.
- DODEL, R., HAMPEL, H., DEPBOYLU, C., LIN, S., GAO, F., SCHOCK, S., JÄCKEL, S., WEI, X., BUERGER, K., HÖFT, C., HEMMER, B., MÖLLER, H. J., FARLOW, M., OERTEL, W. H., SOMMER, N. & DU, Y. 2002. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 52, 253-6.
- DODEL, R., ROMINGER, A., BARTENSTEIN, P., BARKHOF, F., BLENNOW, K., FÖRSTER, S., WINTER, Y., BACH, J. P., POPP, J., ALFERINK, J., WILTFANG, J., BUERGER, K., OTTO, M., ANTUONO, P., JACOBY, M., RICHTER, R., STEVENS, J., MELAMED, I., GOLDSTEIN, J., HAAG, S., WIETEK, S., FARLOW, M. & JESSEN, F. 2013. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol*, 12, 233-43.
- DODEL, R. C., DU, Y., DEPBOYLU, C., HAMPEL, H., FRÖLICH, L., HAAG, A., HEMMETER, U., PAULSEN, S., TEIPEL, S. J., BRETTSCHEIDER, S., SPOTTKE, A., NÖLKER, C., MÖLLER, H. J., WEI, X., FARLOW, M., SOMMER, N. & OERTEL, W. H. 2004. Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75, 1472-4.
- DU, Y., DODEL, R., HAMPEL, H., BUERGER, K., LIN, S., EASTWOOD, B., BALES, K., GAO, F., MOELLER, H. J., OERTEL, W., FARLOW, M. & PAUL, S. 2001. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology*, 57, 801-5.
- DVORKIN, A., BENJAMINI, Y. & GOLANI, I. 2008. Mouse cognition-related behavior in the open-field: emergence of places of attraction. *PLoS Comput Biol*, 4, e1000027.
- ENGVAL, E., JONSSON, K. & PERLMANN, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta*, 251, 427-34.

- ENGVALL, E. & PERLMANN, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-4.
- EPHREM, A., CHAMAT, S., MIQUEL, C., FISSON, S., MOUTHON, L., CALIGIURI, G., DELIGNAT, S., ELLURU, S., BAYRY, J., LACROIX-DESMAZES, S., COHEN, J. L., SALOMON, B. L., KAZATCHKINE, M. D., KAVERI, S. V. & MISRA, N. 2008. Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood*, 111, 715-22.
- FRYE, C. A., WALF, A. A., RHODES, M. E. & HARNEY, J. P. 2004. Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5 alpha-reductase. *Brain Res*, 1004, 116-24.
- GANGRADE, B. K. & DOMINIC, C. J. 1984. Studies of the male-originating pheromones involved in the Whitten effect and Bruce effect in mice. *Biol Reprod*, 31, 89-96.
- GERLAI, R. 1996. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci*, 19, 177-81.
- GILMAN, S., KOLLER, M., BLACK, R. S., JENKINS, L., GRIFFITH, S. G., FOX, N. C., EISNER, L., KIRBY, L., ROVIRA, M. B., FORETTE, F., ORGOGOZO, J. M. & TEAM, A. Q.-.-S. 2005. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, 64, 1553-62.
- GOTO, M., KURIBAYASHI, K., UMEMORI, Y., OHE, Y., ASANUMA, K., TANAKA, M., KOBAYASHI, D. & WATANABE, N. 2010. High prevalence of human anti-mouse antibodies in the serum of colorectal cancer patients. *Anticancer Res*, 30, 4353-6.
- GREGORIUS, K. & THEISEN, M. 2001. In situ deprotection: a method for covalent immobilization of peptides with well-defined orientation for use in solid phase immunoassays such as enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Biochem*, 299, 84-91.
- GRUBER, R., VAN HAARLEM, L. J., WARNAAR, S. O., HOLZ, E. & RIETHMÜLLER, G. 2000. The human antimouse immunoglobulin response and the anti-idiotypic network have no influence on clinical outcome in patients with minimal residual colorectal cancer treated with monoclonal antibody CO17-1A. *Cancer Res*, 60, 1921-6.
- HALEY, P. J. 2003. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, 188, 49-71.
- HOSONO, M., ENDO, K., SAKAHARA, H., WATANABE, Y., SAGA, T., NAKAI, T., KAWAI, C., MATSUMORI, A., YAMADA, T. & WATANABE, T. 1992. Human/mouse chimeric antibodies show low reactivity with human anti-murine antibodies (HAMA). *Br J Cancer*, 65, 197-200.
- HUANG, H. S., SUN, D. S., LIEN, T. S. & CHANG, H. H. 2010. Dendritic cells modulate platelet activity in IVIg-mediated amelioration of ITP in mice. *Blood*, 116, 5002-9.
- HUGHES, R. A., DALAKAS, M. C., CORNBLATH, D. R., LATOV, N., WEKSLER, M. E. & RELKIN, N. 2009. Clinical applications of intravenous immunoglobulins in neurology. *Clin Exp Immunol*, 158 Suppl 1, 34-42.

- HUGHES, R. N. 2004. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev*, 28, 497-505.
- IMBACH, P. 2012. Treatment of immune thrombocytopenia with intravenous immunoglobulin and insights for other diseases. A historical review. *Swiss Med Wkly*, 142, w13593.
- IMBODEN, M., MURPHY, K. R., RAKHMLEVICH, A. L., NEAL, Z. C., XIANG, R., REISFELD, R. A., GILLIES, S. D. & SONDEL, P. M. 2001. The level of MHC class I expression on murine adenocarcinoma can change the antitumor effector mechanism of immunocytokine therapy. *Cancer Res*, 61, 1500-7.
- ISTRIN, G., BOSIS, E. & SOLOMON, B. 2006. Intravenous immunoglobulin enhances the clearance of fibrillar amyloid-beta peptide. *J Neurosci Res*, 84, 434-43.
- JOHNSTON, A. L. & FILE, S. E. 1991. Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav*, 49, 245-50.
- KASTENBERGER, I., LUTSCH, C., HERZOG, H. & SCHWARZER, C. 2012. Influence of sex and genetic background on anxiety-related and stress-induced behaviour of prodynorphin-deficient mice. *PLoS One*, 7, e34251.
- KATZ, R. J., ROTH, K. A. & CARROLL, B. J. 1981. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 5, 247-51.
- KATZ, U., ACHIRON, A., SHERER, Y. & SHOENFELD, Y. 2007. Safety of intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy. *Autoimmun Rev*, 6, 257-9.
- KAZATCHKINE, M. D. & KAVERI, S. V. 2001. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med*, 345, 747-55.
- KIMBALL, J. A., NORMAN, D. J., SHIELD, C. F., SCHROEDER, T. J., LISI, P., GAROVOY, M., O'CONNELL, J. B., STUART, F., MCDIARMID, S. V. & WALL, W. 1995. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. *Transpl Immunol*, 3, 212-21.
- KIOTE-SCHMIDT, C. 2007. *Etablierung eines kompetitiven enzymgekoppelten Immunoassays zum Nachweis eines kleinen Peptids in Serum- und Liquorproben*. Doctoral thesis Inauguraldissertation, Universität Ulm.
- KLAVER, A. C., FINKE, J. M., DIGAMBARANATH, J., BALASUBRAMANIAM, M. & LOEFFLER, D. A. 2010. Antibody concentrations to Abeta1-42 monomer and soluble oligomers in untreated and antibody-antigen-dissociated intravenous immunoglobulin preparations. *Int Immunopharmacol*, 10, 115-9.
- KLEE, G. G. 2000. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med*, 124, 921-3.
- KNEZEVIC-MARAMICA, I. & KRUSKALL, M. S. 2003. Intravenous immune globulins: an update for clinicians. *Transfusion*, 43, 1460-80.
- KOSHIDA, S., ASANUMA, K., KURIBAYASHI, K., GOTO, M., TSUJI, N., KOBAYASHI, D., TANAKA, M. & WATANABE, N. 2010. Prevalence of human anti-mouse antibodies (HAMAs) in routine examinations. *Clin Chim Acta*, 411, 391-4.
- KOTILINEK, L. A., BACSKAI, B., WESTERMAN, M., KAWARABAYASHI, T., YOUNKIN, L., HYMAN, B. T., YOUNKIN, S. & ASHE, K. H. 2002.

- Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 22, 6331-5.
- KUWABARA, S., MORI, M., OGAWARA, K., HATTORI, T., ODA, S., KOGA, M. & YUKI, N. 2001. Intravenous immunoglobulin therapy for Guillain-Barré syndrome with IgG anti-GM1 antibody. *Muscle Nerve*, 24, 54-8.
- LALONDE, R. 2002. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev*, 26, 91-104.
- LAM, L., WHITSETT, C. F., MCNICHOLL, J. M., HODGE, T. W. & HOOPER, J. 1993. Immunologically active proteins in intravenous immunoglobulin. *Lancet*, 342, 678.
- LATHE, R. 2004. The individuality of mice. *Genes Brain Behav*, 3, 317-27.
- LEMM, G. 2002. Composition and properties of IVIg preparations that affect tolerability and therapeutic efficacy. *Neurology*, 59, S28-32.
- LIEBSCH, G., MONTKOWSKI, A., HOLSBOER, F. & LANDGRAF, R. 1998. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res*, 94, 301-10.
- LISAK, R. P. 1998. Intravenous immunoglobulins in multiple sclerosis. *Neurology*, 51, S25-9.
- LISTER, R. G. 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*, 46, 321-40.
- LOEFFLER, D. A., SMITH, L. M., KLAVER, A. C., BRZEZINSKI, H. A., MORRISON, E. I., COFFEY, M. P., STEFICEK, B. A. & COOK, S. S. 2012. Development of antihuman IgG antibodies and hematologic deficits but not clinical abnormalities in C57BL/6 mice after repeated administration of human intravenous immunoglobulin. *Comp Med*, 62, 31-6.
- MAGGA, J., PULI, L., PIHLAJA, R., KANNINEN, K., NEULAMAA, S., MALM, T., HÄRTIG, W., GROSCHE, J., GOLDSTEINS, G., TANILA, H., KOISTINAHO, J. & KOISTINAHO, M. 2010. Human intravenous immunoglobulin provides protection against A $\beta$  toxicity by multiple mechanisms in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 7, 90.
- MENGEL, D., RÖSKAM, S., NEFF, F., BALAKRISHNAN, K., DEUSTER, O., GOLD, M., OERTEL, W. H., BACHER, M., BACH, J. P. & DODEL, R. 2013. Naturally occurring autoantibodies interfere with  $\beta$ -amyloid metabolism and improve cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease 24 h after single treatment. *Transl Psychiatry*, 3, e236.
- MESTAS, J. & HUGHES, C. C. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172, 2731-8.
- MORGAN, D., DIAMOND, D. M., GOTTSCHALL, P. E., UGEN, K. E., DICKEY, C., HARDY, J., DUFF, K., JANTZEN, P., DICARLO, G., WILCOCK, D., CONNOR, K., HATCHER, J., HOPE, C., GORDON, M. & ARENDASH, G. W. 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, 408, 982-5.
- MORGAN, M. A. & PFAFF, D. W. 2001. Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice. *Horm Behav*, 40, 472-82.
- MORRIS, R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11, 47-60.
- MURPHY, K., TRAVERS, P. & WALPORT, M. 2009. *Janeway Immunologie*.

- NAKAMURA, Y., YASHIRO, M., UEHARA, R., OKI, I., WATANABE, M. & YANAGAWA, H. 2008. Epidemiologic features of Kawasaki disease in Japan: results from the nationwide survey in 2005-2006. *J Epidemiol*, 18, 167-72.
- NAVARRO, R. P., BALLOW, M., FENRICK, B. & PEZALLA, E. J. 2012. Considerations for the optimal use of immunoglobulin. *Am J Manag Care*, 18, S67-78.
- NECHANSKY, A. 2010. HAHA--nothing to laugh about. Measuring the immunogenicity (human anti-human antibody response) induced by humanized monoclonal antibodies applying ELISA and SPR technology. *J Pharm Biomed Anal*, 51, 252-4.
- NEFF, F., WEI, X., NÖLKER, C., BACHER, M., DU, Y. & DODEL, R. 2008. Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders. *Autoimmun Rev*, 7, 501-7.
- NIMMERJAHN, F. & RAVETCH, J. V. 2008a. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol*, 26, 513-33.
- NIMMERJAHN, F. & RAVETCH, J. V. 2008b. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 8, 34-47.
- NOVAK, P., WILLIAMS, A., RAVIN, P., ZURKIYA, O., ABDULJALIL, A. & NOVAK, V. 2012. Treatment of multiple system atrophy using intravenous immunoglobulin. *BMC Neurol*, 12, 131.
- OEI, A. L., SWEEP, F. C., GEURTS-MOESPOOT, A., VAN TIENOVEN, D., VON MENSCHDORFF-POUILLY, S., THOMAS, C. M. & MASSUGER, L. F. 2008. Human anti-mouse IgM and IgG responses in ovarian cancer patients after radioimmunotherapy with 90Y-muHMFG1. *Anticancer Res*, 28, 2721-5.
- OLIVIERI, B. P., VASCONCELLOS, R., NÓBREGA, A., MINOPRIO, P., KAVERI, S. V. & ARAÚJO-JORGE, T. C. 2010. Intravenous immunoglobulin increases survival time in the acute phase of experimental Chagas disease. *Parasite Immunol*, 32, 464-9.
- PAPOIAN, R. 1992. Non-specific immunoglobulin interactions may lead to false-positive results in assays for human anti-mouse monoclonal antibodies (HAMA). *J Immunoassay*, 13, 289-96.
- PIERCE, L. R. & JAIN, N. 2003. Risks associated with the use of intravenous immunoglobulin. *Transfus Med Rev*, 17, 241-51.
- PORSTMANN, T. & KIESSIG, S. T. 1992. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J Immunol Methods*, 150, 5-21.
- RELKIN, N. R. 2008. Current state of immunotherapy for Alzheimer's disease. *CNS Spectr*, 13, 39-41.
- RELKIN, N. R., SZABO, P., ADAMIAK, B., BURGUT, T., MONTHE, C., LENT, R. W., YOUNKIN, S., YOUNKIN, L., SCHIFF, R. & WEKSLER, M. E. 2009. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 30, 1728-36.
- ROTH, K. A. & KATZ, R. J. 1979. Stress, behavioral arousal, and open field activity--a reexamination of emotionality in the rat. *Neurosci Biobehav Rev*, 3, 247-63.
- RYAN, B. C. & VANDENBERGH, J. G. 2002. Intrauterine position effects. *Neurosci Biobehav Rev*, 26, 665-78.
- RÖSKAM, S., NEFF, F., SCHWARTING, R., BACHER, M. & DODEL, R. 2010. APP transgenic mice: the effect of active and passive immunotherapy in cognitive tasks. *Neurosci Biobehav Rev*, 34, 487-99.

- SALAMA, A., MUELLER-ECKHARDT, C. & KIEFEL, V. 1983. Effect of intravenous immunoglobulin in immune thrombocytopenia. *Lancet*, 2, 193-5.
- SARTER, M., BODEWITZ, G. & STEPHENS, D. N. 1988. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. *Psychopharmacology (Berl)*, 94, 491-5.
- SCHENK, D. 2002. Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat Rev Neurosci*, 3, 824-8.
- SCHENK, D., BARBOUR, R., DUNN, W., GORDON, G., GRAJEDA, H., GUIDO, T., HU, K., HUANG, J., JOHNSON-WOOD, K., KHAN, K., KHOLODENKO, D., LEE, M., LIAO, Z., LIEBERBURG, I., MOTTER, R., MUTTER, L., SORIANO, F., SHOPP, G., VASQUEZ, N., VANDEVERT, C., WALKER, S., WOGULIS, M., YEDNOCK, T., GAMES, D. & SEUBERT, P. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400, 173-7.
- SCHWARTZ-ALBIEZ, R., MONTEIRO, R. C., RODRIGUEZ, M., BINDER, C. J. & SHOENFELD, Y. 2009. Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clin Exp Immunol*, 158 Suppl 1, 43-50.
- SECCAMANI, E., TATTANELLI, M., MARIANI, M., SPRANZI, E., SCASSELLATI, G. A. & SICCARDI, A. G. 1989. A simple qualitative determination of human antibodies to murine immunoglobulins (HAMA) in serum samples. *Int J Rad Appl Instrum B*, 16, 167-70.
- SEVIER, E. D., DAVID, G. S., MARTINIS, J., DESMOND, W. J., BARTHOLOMEW, R. M. & WANG, R. 1981. Monoclonal antibodies in clinical immunology. *Clin Chem*, 27, 1797-806.
- SHOENFELD, Y. & KATZ, U. 2005. IVIg therapy in autoimmunity and related disorders: our experience with a large cohort of patients. *Autoimmunity*, 38, 123-37.
- SORENSEN, P. S., FAZEKAS, F. & LEE, M. 2002. Intravenous immunoglobulin G for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: a meta-analysis. *Eur J Neurol*, 9, 557-63.
- SUAREZ, S. D. & GALLUP, G. G. J. 1981 (August). An Ethological Analysis of Open-Field Behavior in Rats and Mice. *Learning and Motivation, Academic Press Inc.*, Volume 12, Pages 342-363.
- SVETLICKY, N., BLANK, M. & ZANDMAN-GODDARD, G. 2012. The beneficial effects of intravenous immunoglobulin for antineutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis. *Isr Med Assoc J*, 14, 568-9.
- SVETLICKY, N., ORTEGA-HERNANDEZ, O. D., MOUTHON, L., GUILLEVIN, L., THIESEN, H. J., ALTMAN, A., KRAVITZ, M. S., BLANK, M. & SHOENFELD, Y. 2013. The advantage of specific intravenous immunoglobulin (sIVIg) on regular IVIG: experience of the last decade. *J Clin Immunol*, 33 Suppl 1, S27-32.
- SZOLAR, O. H., STRANNER, S., ZINOECKER, I., MUDDE, G. C., HIMMLER, G., WAXENECKER, G. & NECHANSKY, A. 2006. Qualification and application of a surface plasmon resonance-based assay for monitoring potential HABA responses induced after passive administration of a humanized anti Lewis-Y antibody. *J Pharm Biomed Anal*, 41, 1347-53.

- THORPE, S. J., TURNER, C., HEATH, A., FEAVERS, I., VATN, I., NATVIG, J. B. & THOMPSON, K. M. 2003. Clonal analysis of a human antimouse antibody (HAMA) response. *Scand J Immunol*, 57, 85-92.
- TJANDRA, J. J., RAMADI, L. & MCKENZIE, I. F. 1990. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol*, 68 ( Pt 6), 367-76.
- WEKSLER, M. E., RELKIN, N., TURKENICH, R., LARUSSE, S., ZHOU, L. & SZABO, P. 2002. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol*, 37, 943-8.
- WITTSTOCK, M., BENECKE, R. & ZETTL, U. K. 2003. Therapy with intravenous immunoglobulins: complications and side-effects. *Eur Neurol*, 50, 172-5.

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

---

Prof. Dr. Gerhard Aumüller	Prof. Michael Lohoff
Prof. Dr. Peter Barth	Prof. Rolf Felix Maier
Prof. Detlef K. Bartsch	Prof. Bernhard Maisch
Prof. Erika Baum	Prof. Roland Moll
Prof. Katja Becker	Prof. Rainer Moosdorf
Prof. Stephan Becker	Prof. Ulrich Otto Mueller
Prof. Dr. Thomas Behr	Prof. Andreas Neubauer
Prof. Gregor Bein	Dr. Beate Kolb-Niemann
Prof. Roswitha Berger	Prof. Christopher Nimsky
Prof. Siegfried Bien	Prof. Dr. Wolfgang Hermann Oertel
Prof. Rita Engenhardt-Cabillic	Dr. Egbert Opitz
Prof. Frank Czubayko	Prof. Axel Frieder Pagenstecher
Prof. Jürgen Daut	Prof. Tim Plant
Prof. Dr. Richard Dodel	Prof. Harald Renz
Dr. Barbara Federspiel	Prof. Gerd Richter
Dr. Beate Feuser	Prof. Klaus-Heinrich Röhm
Prof. Susanne Fuchs-Winkelmann	Dr. Frank Rose
Prof. Dr. Christian Görg	Prof. Dr. Matthias Rothmund
Prof. Thomas M. Gress	Prof. Steffen Ruchholtz
Prof. Karl-Heinz Grzeschik	Prof. Helmut Schäfer
Prof. Michael Hertl	Prof. Stephan Schmidt
PD Helmut Höffken	Dr. Mihailo Sekulovski
Prof. Rainer Hofmann	Prof. Walter Sekundo
Prof. Joachim Hoyer	Prof. Dr. Andreas Sesterhenn
Prof. Peter H. Kann	Prof. Dr. Afshin Teymoortash
Prof. Tilo Kircher	Prof. Claus F. Vogelmeier
Prof. Dr. Volker Klingmüller	Prof. Uwe Wagner
Prof. Klaus Jochen Klose	Prof. Eberhard Weihe
Prof. Jan Koolman	Prof. Jochen A. Werner
Prof. Dr. Roland Lill	Prof. Hinnerk Wulf



## Danksagung

---

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, daher möchte ich mich an dieser Stelle allen Menschen danken, die mir die Erstellung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Zuerst Herrn Prof. Dr. Dodel, bei dem ich mich für die freundliche Betreuung, sowie die Bereitstellung der Materialien und des Arbeitsplatzes bedanken möchte.

Dr. Stephan Röskam danke ich für die geduldige und wissenschaftliche Betreuung, Begutachtung und Förderung meiner Arbeit. Seine Anregungen und kritischen Kommentare und Diskussionen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährt wurde.

Auch Dr. Michael Bacher und Dr. Jens-Peter Reese danke ich für die Unterstützung bei Fragen zu Methodik und Statistik. Herrn Andreas Kauz und meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Neurologische Therapieforschung danke ich für die harmonische Stimmung und Hilfsbereitschaft bei Fragen jeder Art, sie alle gewährten mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung.

Desweiteren muss ich Nadine Müller für ihre Unterstützung beim Aufbauen, Einrichten und Einstellen der Versuchsaapparaturen für die Verhaltensversuche danken.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern, die mich in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben.

## Ehrenwörtliche Erklärung

---

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „MESSUNG DER MURINEN ANTI-HUMANEN ANTIKÖRPERREAKTION SOWIE BEURTEILUNG DER ALLEGEMEINEN AKTIVITÄT UND KOGNITION VON GESUNDEN ADULTEN MÄUSEN NACH BEHANDLUNG MIT INTRAVENÖSEN IMMUNGLOBULINEN“ in der Klinik für Neurologie unter der kommissarischen Leitung von Prof. Dr. med. Richard Dodel mit Unterstützung von Prof. Dr. med. Richard Dodel und Dr.rer.nat. Stephan Röskam ohne sonstige Hilfe selbstständig durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischem Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Anteile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in der *Zeitschrift European Journal of Inflammation* September 2014 vol. 12 no. 3 veröffentlicht.

Marburg, den 03.05.2016